

CP



**PCT**  
**ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL**  
**Oficina Internacional**  
**SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION**  
**EN MATERIA DE PATENTES (PCT)**

(51) Clasificación Internacional de Patentes <sup>6</sup> : <b>C12N 15/54, 15/82, 9/10, 9/16, A01H 5/00</b>		<b>A2</b>	(11) Número de publicación internacional: <b>WO 97/42327</b>
			(43) Fecha de publicación internacional: <b>13 de Noviembre de 1997 (13.11.97)</b>
(21) Solicitud internacional: <b>PCT/MX97/00012</b> (22) Fecha de la presentación internacional: <b>6 de Mayo de 1997 (06.05.97)</b> (30) Datos relativos a la prioridad: <b>961719                      8 de Mayo de 1996 (08.05.96)    MX</b> (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): <b>UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO</b> <b>[MX/MX]; 9º Piso de la Torre de Rectoría, Ciudad Univer-</b> <b>sitaria, Coyoacán, México, D.F. 04510 (MX).</b> (72) Inventores; e (75) Inventores/solicitantes (sólo US): <b>ITURRIAGA DE LA</b> <b>FUENTE, Gabriel [MX/MX]; Nueva Francia No. 211-1,</b> <b>Col. Lomas de Cortés, Cuernavaca, Morelos 62240 (MX).</b> <b>ZENTELLA GOMEZ, Rodolfo [MX/MX]; Hacienda de</b> <b>Corlome No. 24, Col. Floresta, Coyoacán, México, D.F.</b> <b>14310 (MX).</b> (74) Mandatario: <b>LOBATO ESPINOSA, José Luis; 9º Piso de la</b> <b>Torre de Rectoría, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México,</b> <b>D.F. 04510 (MX).</b>		(81) Estados designados: <b>AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU,</b> <b>CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV,</b> <b>MG, MK, MN, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA,</b> <b>US, UZ, VN, Patente ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ,</b> <b>UG), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,</b> <b>TJ, TM), Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI,</b> <b>FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), Patente OAPI</b> <b>(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD,</b> <b>TG).</b> Publicada <i>Sin informe de búsqueda internacional, será publicada nue-</i> <i>vamente cuando se reciba dicho informe.</i>	
(54) Title: <b>METHOD FOR INCREASING THE CONTENT OF TREHALOSE IN ORGANISMS THROUGH THE TRANSFORMATION THEREOF WITH THE cDNA OF THE TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHETASE/PHOSPHATASE OF SELAGINELLA LEPIDOPHYLLA</b> (54) Título: <b>MÉTODO PARA INCREMENTAR EL CONTENIDO DE TREHALOSA DE LOS ORGANISMOS POR MEDIO DE SU TRANSFORMACIÓN CON EL ADNc DE LA TREHALOSA-6-FOSFATO SINTASA/POSFATASA DE SELAGINELLA LEPIDOPHYLLA</b> (57) Abstract <p>The invention discloses the cloning and determination of the nucleotide sequence of a complete molecule of complementary DNA which codes for the bifunctional enzyme trehalose-6-phosphate synthetase/phosphatase of plants. The complementary DNA molecule codes for a bifunctional enzyme which synthesizes trehalose. The complementary DNA can be subcloned into vectors appropriate for the expression thereof in host cells. The transformed cells produce trehalose, contrary to non transformed cells, thereby increasing the tolerance to stress induced by heat, cold, salinity and dryness. This invention can be used to improve the thermotolerance and osmotolerance of plants cultivated in dry and semidry areas and will also contribute to reduce the use of water for watering purposes. Also, the trehalose produced in transgenic plants could extend the shelf-life of agricultural products, preserving them during long periods of time in dehydrated condition without losing the odour, taste and texture characteristics, once they are rehydrated. Finally, the over-production of trehalose in bacteria, yeasts, fungi, animal cells or transgenic plants will constitute an economical source of said product to be used as additive to preserve various biological products or processed food products.</p> (57) Resumen <p>Se clonó y determinó la secuencia nucleotídica de una molécula completa de ADN complementario que codifica para la enzima bifuncional trehalosa-6-fosfato sintasa/fosfatasa de plantas. La molécula de ADN complementario codifica para una enzima bifuncional que sintetiza trehalosa. El ADN complementario se puede subclonar en vectores apropiados para su expresión en células huéspedes. Las células transformadas producen trehalosa, en contraste con las células no transformadas, lo cual aumentará la tolerancia al estrés por calor, frío, salinidad y sequía. Esta invención se podrá usar para mejorar la termotolerancia y osmotolerancia de las plantas cultivadas en zonas áridas o semiáridas y también contribuirá a disminuir el uso de agua de riego. Por otro lado, la trehalosa producida en plantas transgénicas podría incrementar la vida de anaquel de los productos agrícolas, preservándolos por periodos largos en estado deshidratado sin que estos pierdan sus propiedades de olor, sabor y textura, una vez que sean rehidratados. Por último, la sobreproducción de trehalosa en bacterias, levaduras, hongos, células animales o plantas transgénicas constituirá una fuente barata de este producto para ser usado como aditivo para preservar diversos productos biológicos o alimentos procesados.</p>			

# UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslovenia
AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	Eslovaquia
AT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ	Swazilandia
AZ	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Mónaco	TD	Chad
BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tayikistán
BE	Bélgica	GN	Guinea	MK	Ex República Yugoslava de Macedonia	TM	Turkmenistán
BF	Burkina Faso	GR	Grecia	ML	Malí	TR	Turquía
BG	Bulgaria	HU	Hungría	MN	Mongolia	TT	Trinidad y Tabago
BJ	Benin	IE	Irlanda	MR	Mauritania	UA	Ucrania
BR	Brasil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Islandia	MX	México	US	Estados Unidos de América
CA	Canadá	IT	Italia	NE	Níger	UZ	Uzbekistán
CF	República Centroafricana	JP	Japón	NL	Países Bajos	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Noruega	YU	Yugoslavia
CH	Suiza	KG	Kirguistán	NZ	Nueva Zelanda	ZW	Zimbabue
CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular Democrática de Corea	PL	Polonia		
CM	Camerún	KR	República de Corea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakstán	RO	Rumania		
CU	Cuba	LC	Santa Lucía	RU	Federación de Rusia		
CZ	República Checa	LI	Liechtenstein	SD	Sudán		
DE	Alemania	LK	Sri Lanka	SE	Suecia		
DK	Dinamarca	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estonia						

Método para incrementar el contenido de trehalosa de los organismos por medio de su transformación con el ADNc de la trehalosa-6- fosfato sintasa/fosfatasa de *Selaginella lepidophylla*.

#### CAMPO TECNICO

La presente invención se refiere al empleo de técnicas de ADN recombinante para la modificación genética del metabolismo de carbohidratos de los organismos, el ADN necesario para ello, la(s) enzima(s) involucrada(s) en la síntesis de carbohidratos específicos, así como los organismos modificados y sus partes. Dichos organismos o sus partes pueden ser utilizados para la producción de dichos carbohidratos específicos, o bien, pueden ser procesados como alimentos o ingredientes, teniendo propiedades mejoradas por la presencia de dichos carbohidratos.

#### ANTECEDENTES

La acumulación de solutos compatibles con el metabolismo en diversos organismos tales como bacterias, algas, levaduras, hongos, insectos, crustáceos y plantas, surgió en la Evolución como un mecanismo adaptativo para contender con la escasez de agua, salinidad o congelamiento debido a las propiedades osmoregulatorias de dichos solutos. Entre estos compuestos osmóticamente activos se encuentran los polioles sorbitol, manitol, arabitol o glicerol; aminoácidos como la prolina o el derivado glicín-betaína; y los disacáridos sacarosa y trehalosa [Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D. & Somero, G.N. (1982) *Science* 217: 1214-1222].

Además de ser osmolitos, se consideran osmoprotectores al glicerol, la sacarosa y la trehalosa ya que juegan un papel clave en la estabilización estructural y funcional de membranas y proteínas en estado anhidro. Esto parece deberse a que las moléculas de agua son reemplazadas por el osmoprotector que de esta manera mantiene solvatadas a las macromoléculas de la célula [Clegg, J.S. (1985) *The physical properties and metabolic status of Artemia cysts at low water contents: The "water replacement hypothesis"*, pp. 169-187. En: *Membranes, metabolism*

and dry organisms. Leopold, A.C. (Ed.). Cornell Univ. Press, Ithaca, Nueva York]. En particular la trehalosa tiene las mejores propiedades biofísicas y bioquímicas como osmoprotector [Crowe, J.H., Crowe, L.M. & Chapman D. (1984) Science 223: 701-703; Crowe, J.H., Crowe, L.M., Carpenter, J.F. & Wistrom, A. (1987) Biochem. J. 242: 1-10].

La trehalosa [O-alfa-D-glucopiranosil-(1-1)-alfa-D-glucopiranosil] es un dímero de dos moléculas de glucosa unidas a través de sus grupos reductores. Estos grupos reductores están ausentes en la trehalosa, por lo que no toma parte en las reacciones de Maillard, en las cuales el grupo reductor de los azúcares reacciona con el grupo amino de las proteínas causando oscurecimiento y cambio en el olor y sabor de los alimentos [Nursten, H.E. (1986) Maillard browning reactions in dried foods, pp. 53-68. En: Concentration and drying of foods. Macarthy, D. (Ed.). Elsevier Applied Science, Londres].

Estudios con liposomas utilizando calorimetría, espectroscopía de infrarojo, resonancia magnética nuclear y difracción de rayos X, demuestran que la trehalosa es capaz de mantener los lípidos en fase fluida en la ausencia de agua y como consecuencia evita separación de fase, ruptura y disgregación de las membranas [Crowe, J.H., Crowe, L.M. & Jackson, S.A. (1983) Arch. Biochem. Biophys. 220: 477-484; Crowe, J.H., Crowe, L.M. & Chapman D. (1984) Science 223: 701-703; Crowe, L.M., Womersley, C., Crowe, J.H., Reid, D., Appel, L., & Rudolph, A. (1986) Biochem. Biophys. Acta 861: 131-140; Crowe, J.H., Crowe, L.M., Carpenter, J.F. & Wistrom, A. (1987) Biochem. J. 242: 1-10; Lee, C.W.B., Waugh, J.S. & Griffin, R.G. (1986) Biochemistry 25: 3724-3737; Lis, L.J., Tamura-Lis, W., Lim, T.K. & Quinn, P.J. (1990) Biochim. Biophys. Acta 1021: 201-204]. Se ha propuesto que esto se debe a la interacción de los grupos hidroxilo de la trehalosa con los grupos fosfato de los fosfolípidos a través de puentes de hidrógeno y también a la interacción trehalosa-trehalosa que encapsula a las membranas evitando la salida de otras moléculas presentes en su interior.

Se ha encontrado que la trehalosa es capaz de preservar la actividad de enzimas mantenidas bajo deshidratación total. Por ejemplo, si la T7 ADN polimerasa, T4 ADN ligasa o diversas

enzimas de restricción se deshidratan en presencia de trehalosa y se mantienen en este estado por varios meses, aun a 37, 55 o 70°C, al cabo de este tiempo recuperan el 100% de su actividad al ser rehidratadas [Colaço, C., Sen, S., Thangavelu, M.,  
5 Pinder, S. & Roser, B. (1992) Bio/Technology 10: 1007-1111].

Por otro lado, células de zanahoria o tabaco se pueden criopreservar en presencia de trehalosa [Bhandal, I.S., Hauptman, R.M. & Widholm, J.M. (1985) Plant Physiol. 78: 430-432]. Se ha reportado que concentraciones de trehalosa  
10 menores a 2mM son mucho más eficientes que la sacarosa para criopreservar tilacoides aislados de espinaca [Hincha, D.K. (1989) Biochem. Biophys. Acta 987: 231-234].

Entre los organismos que sintetizan trehalosa se encuentran las bacterias, levaduras, algunos hongos, esporas, nemátodos,  
15 larvas de crustáceos, insectos y plantas, particularmente algunas de resurrección como *Myrothamnus flabellifolius* y *Selaginella lepidophylla* [Adams, R.P., Kendall, E. & Kartha, K.K. (1990) Biochem. Systematics & Ecology 18: 107-110; Bianchi, G., Gamba, A., Murelli, C., Salamini, F. & Bartels, D. (1993)  
20 Physiol. Plant. 87: 223-226; Weisburd, S. (1988) Sci. News 133: 107-110]. Esta última especie produce al menos tres veces más trehalosa que *M. flabellifolius* [Müller, J., Boller, T. & Wiemken, A. (1995) Plant Science 112: 1-9]. En *S. lepidophylla* la trehalosa constituye el 80% de los carbohidratos solubles,  
25 por lo que esta planta es uno de los organismos con más alto contenido de trehalosa. Esta planta puede ser criopreservada en nitrógeno líquido y al descongelarse revive normalmente, como también sobrevive al vacío extremo, calor hasta de 100°C o altas dosis de radiación ionizante sin sufrir daño [Roser, B. (1991)  
30 Trends Food Sci. Technol. 2: 166-169; Roser, B. & Colaço, C. (1993) New Scient. 138: 25-28; Weisburd, S. (1988) Sci. News 133: 107-110].

La biosíntesis de la trehalosa en *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* consiste de dos pasos enzimáticos  
35 catalizados por la trehalosa-6-fosfato sintasa, que produce trehalosa-6-fosfato a partir de glucosa-6-fosfato y UDP-glucosa, y por la trehalosa-6-fosfato fosfatasa, que produce finalmente trehalosa [Bell, W., Klaassen, P., Ohnacker, M., Boller, T., Herweijer, M., Schoppink, P., Van Der Zee & Weimken, A. (1992)

- Eur. J. Biochem. 209: 951-959; Cabib, E. & Leloir, L.F. (1957) J. Biol. Chem. 231: 259-275; Giaver, H.M., Styrvold, O.B., Kaasen, I. & Strom, A.R. (1988) J. Bacteriol. 170: 2841-2849; Londesborough, J. & Vuorio, O. (1991) J. Gen. Microbiol. 137: 323-330]. Los genes de ambas enzimas ya han sido aislados y secuenciados, tanto de bacteria como de levadura [Bell, W., Klaassen, P., Ohnacker, M., Boller, T., Herweijer, M., Schoppink, P., Van Der Zee & Weimken, A. (1992) Eur. J. Biochem. 209: 951-959; De Virgilio, C., Bürckert, N., Bell, W., Jenö, P., Boller, T. & Weimken A. (1993) Eur. J. Biochem. 212: 315-323; Kaasen, I., Falkenberg, P., Styrvold, O.B. & Strom, A.R. (1992) J. Bacteriol. 174: 889-898; McDougall, J., Kaasen, I. & Strom, A.R. (1993) FEMS Microbiol. Let. 107: 25-30].

La delección de los genes *otsA* u *otsB* de *E. coli*, que codifican para la trehalosa-6-fosfato sintasa y fosfatasa, respectivamente, causa pérdida de la osmotolerancia y termotolerancia. Además, la transcripción de los genes *otsA* y *otsB* se induce bajo el estrés osmótico y calórico [Kaasen, I., Falkenberg, P., Styrvold, O.B. & Strom, A.R. (1992) J. Bacteriol. 174: 889-898; Hengge-Aronis, R., Klein, W., Lange, R., Rimmele, M. & Boos, W. (1991) J. Bacteriol. 173: 7918-7924].

En la levadura *S. cerevisiae*, el oligómero de la trehalosa-6-fosfato sintasa/fosfatasa consta de tres subunidades, TPS1 (56 kD), TPS2 (100 kD) y TPS3 (130 kD), que corresponden a la trehalosa-6-fosfato sintasa, trehalosa-6-fosfato fosfatasa y un polipéptido de posible función regulatoria, respectivamente [Bell, W., Klaassen, P., Ohnacker, M., Boller, T., Herweijer, M., Schoppink, P., Van Der Zee & Weimken, A. (1992) Eur. J. Biochem. 209: 951-959; De Virgilio, C., Bürckert, N., Bell, W., Jenö, P., Boller, T. & Weimken A. (1993) Eur. J. Biochem. 212: 315-323; Thevelein, J.M. & Hohmann, S. (1995) Trends Biochem. Sci. 20: 3-10; Vuorio, O.E., Kalkkinen, N. & Londesborough, J. (1993) Eur. J. Biochem. 216: 849-861].

La actividad de la holoenzima trehalosa-6-fosfato sintasa/fosfatasa de levadura, tiene una regulación compleja y aún poco entendida. En primer lugar, la subunidad TPS1 parece ser activada por desfosforilación [Panek, A.C., de Araujo, P.S., Neto, M.V. & Panek, A.D. (1987) Curr. Genet. 11: 459-465]. Por

otro lado, se ha sugerido que la incapacidad de la levadura de crecer en glucosa cuando se inactiva el gen de TPS1 por mutación, se debe al papel que juega la subunidad TPS1 en regular la entrada de glucosa a la célula [Thevelein, J.M. & Hohmann, S. (1995) Trends Biochem. Sci. 20: 3-10]. Esta doble función para la TPS1, sintasa y sensor de glucosa, plantea un mecanismo de regulación metabólica donde pareciera estar involucrada una cinasa dependiente de AMP cíclico como señal para la desactivación de la TPS1 [Panek, A.C., de Araujo, P.S., Neto, M.V. & Panek, A.D. (1987) Curr. Genet. 11: 459-465; Thevelein, J.M. & Hohmann, S. (1995) Trends Biochem. Sci. 20: 3-10].

Existe clara evidencia genética y bioquímica en la levadura del papel de la trehalosa en la tolerancia al calor [De Virgilio, C., Hottiger, T., Dominguez, J., Boller, T. & Wiemken, A. (1994) Eur. J. Biochem. 219: 179-186; Hottiger, T., De Virgilio, C., Hall, M.N., Boller, T. & Weimken, A. (1994) Eur. J. Biochem. 219: 187-193], congelamiento [Oda, Y., Uno, K. & Ohta, S. (1986) App. & Environ. Microbiol. 52: 941-943] y estrés por deshidratación [Gadd, G.M., Chalmers, K. & Reed R.H. (1987) FEMS Microbiol. Lett. 48: 249-254].

Se ha reportado la síntesis de trehalosa en tabaco transgénico utilizando los genes *otsA* y *otsB* de *E. coli* bajo el control del promotor 35S. Sin embargo, los niveles de trehalosa fueron del 0.012 % del peso fresco, lo cual resulta ser insuficiente para fines de escalamiento e industrialización [Goddijn, O.J.M., Verwoerd, T.C., Voogd, E., Krutwagen, R., de Graaf, P., van Dun, K., de Laat, A. & van den Elzen, P. (1995) Plant Physiol. 108 Supplement: 149]. Recientemente, se reportó la obtención de plantas transgénicas de tabaco tolerantes a sequía utilizando el gene TPS1 de levadura [Holmström, K.-O., Mäntylä, E., Welin, B., Mandal, A., Palva, E.T., Tunnela, O.E. & Londesborough, J. (1996) Nature 379: 683-684]. La síntesis de trehalosa en dichas plantas constituye de 0.08 a 0.32% peso seco, lo que significa una acumulación baja en trehalosa, con el fin de escalar la producción de este disacárido en plantas transgénicas.

La sobreexpresión de genes heterólogos en un organismo dado, debe tener en cuenta que el uso de codones es distinto

La sobreexpresión de genes heterólogos en un organismo dado, debe tener en cuenta que el uso de codones es distinto para especies lejanas desde el punto de vista filogenético [Fox, T.D. (1987) Ann. Rev. Genet. 21: 67-91]. Por lo que la expresión  
5 en células vegetales de genes de levadura o bacteria, podría no ser alta por la incapacidad de la célula para traducir eficientemente estos transcritos. La expresión de los genes TPS1 y TPS2 de levadura, o de los genes *otsA* y *otsB* de *E. coli* en las células vegetales, podría verse limitada. Para resolver este  
10 problema se ha sugerido modificar los codones de la TPS1 y TPS2 por mutagénesis dirigida [Londesborough, J. & Vuorio, O., Helsinki Finlandia, 05422254 (Jun-06-1995)].

Otra estrategia para producir masivamente trehalosa en plantas sería utilizando genes provenientes de las plantas  
15 mismas. El aislamiento del ADNc de la trehalosa-6-fosfato sintasa/fosfatasa de la planta de resurrección *Selaginella lepidophylla*, que produce trehalosa a niveles de los más altos hasta ahora reportados para un organismo (10% del peso seco vs. levadura que produce 15% del peso seco) [Müller, J., Boller, T.  
20 & Wiemken, A. (1995) Plant Science 112: 1-9], permitirá obviar el problema citado anteriormente, cuando dicho gen sea sobreexpresado en plantas. Esto se debe a cuatro razones. Primero, el gen *sl-tps/p* que codifica para la trehalosa-6-fosfato sintasa y trehalosa-6-fosfato fosfatasa, se  
25 transcribe constitutivamente y correlaciona con los altos niveles de trehalosa reportados en *S. lepidophylla*, tanto hidratada como seca. Debido a lo anterior, no parece tener un mecanismo de regulación postraducciona l o metabólico que limite su actividad enzimática, caso contrario a la TPS1 de levadura.  
30 Segundo, dado que *sl-tps/p* es un gen de copia única en *S. lepidophylla*, la síntesis de trehalosa en esta planta se debe exclusivamente a la enzima codificada (SL-TPS/P) por dicho gen. Por lo que se espera que este solo gen, *sl-tps/p*, sea capaz de producir altos niveles de trehalosa al ser expresado en  
35 organismos transgénicos. Tercero, el uso de codones de *sl-tps/p* es más cercano al de otras plantas, en contraste con *E. coli* o levadura. Esto redundará en la producción de niveles considerablemente más altos de trehalosa en plantas que sobreexpresen el gen de la *sl-tps/p*. Por último, ya que el



sobreexpresen el gen de la *sl-tps/p*. Por último, ya que el producto del gen *sl-tps/p* de *S. lepidophylla* es una enzima bifuncional, contiene las actividades catalíticas de sintasa y fosfatasa, técnicamente es más sencillo introducir un solo gen  
5 que varios.

El uso potencial de la trehalosa abarca la industria agroalimentaria y farmacéutica. Por un lado, la síntesis de trehalosa en plantas transgénicas permitirá que estas puedan sobrevivir a condiciones limitantes de agua, exceso de calor,  
10 frío o salinidad. Esto redundará en un aumento en la productividad de la agricultura de temporal y en zonas áridas o semiáridas. Más aun, dada la previsible escasez de agua a nivel mundial para las próximas décadas, la agricultura de irrigación también se verá limitada. Bajo estas condiciones, la disminución  
15 en el uso de agua no afectaría el rendimiento y productividad de los cultivos que sinteticen trehalosa. Además, las plantas o partes de ellas que sinteticen trehalosa, podrán ser preservadas en estado deshidratado por largos períodos sin la necesidad de refrigeración, y conservando las propiedades organolépticas que  
20 el consumidor demanda. Este aumento sin precedente en la vida de anaquel de los productos agrícolas, tendrá una fuerte repercusión en su mercado ya que disminuirá los costos de transporte y almacenamiento.

En segundo lugar, la síntesis de altos niveles de trehalosa  
25 en plantas u otros organismos transformados, representa potencialmente una fuente barata de trehalosa para la industria si se compara con el precio actual de la obtención de trehalosa de levadura que equivale a doscientos dólares estadounidenses por kilogramo [Kidd, G. & Devorak, J. (1994) *Bio/Technol.* 12:  
30 1328-1329]. La trehalosa es un aditivo que tiene la propiedad única de preservar a los alimentos en estado deshidratado y conservar sus propiedades de sabor, olor y consistencia al ser rehidratados. Debido a lo anterior, los alimentos procesados al incorporar trehalosa en su preparación vendrán a ser  
35 considerados como frescos al ser rehidratados. Esto implica además, que se podrá prescindir de toda clase de conservadores y preservadores que todavía se usan, pero que el consumidor los rechaza por el efecto nocivo, posible o demostrado, que representan para su salud. Más aun, el hecho de que la trehalosa

representan para su salud. Más aun, el hecho de que la trehalosa preserve activas las biomoléculas implica que los alimentos deshidratados que la contengan tendrán un valor nutricional, comparable a los productos frescos, y mayor que aquellos  
5 alimentos deshidratados que carezcan de trehalosa. Además, se debe remarcar que el proceso mismo de deshidratación en presencia de trehalosa, esto es de secado al aire, representa el método más barato que hay en el mercado para deshidratar alimentos, sus derivados o biomoléculas [Roser, B. (1991) Trends  
10 Food Sci. & Tech. 2: 166-169].

La enzima trehalasa, que degrada la trehalosa en dos moléculas de glucosa, se encuentra en el tracto digestivo de los mamíferos y humanos. Dado que una gama de alimentos que se consumen cotidianamente, tales como la miel de abeja, hongos,  
15 pan, cerveza, vino y vinagre contienen trehalosa [Roser, B. & Colaço, C. (1993) New Scient. 138: 25-28], el consumo de este disacárido en otros alimentos no presenta un riesgo para la salud [Gudmand-Hoyer, E. (1994) Am. J. Clin. Nutr. 59(suppl.): 735S-741S]. De hecho, el uso de la trehalosa como aditivo para  
20 preservar alimentos ya ha sido aprobado en Inglaterra [Roser, B. (1991) Eur. Biotechnol. News 111: 2], por lo que su aprobación en México, EE.UU. u otros países no debe ser un problema.

Por último, la disponibilidad de cantidades masivas de trehalosa permitirá su uso como preservador de enzimas, vacunas,  
25 hormonas y otras proteínas y medicamentos en estado deshidratado sin que pierdan bioactividad.

#### RESUMEN DE LA INVENCION

La invención que aquí se describe consiste en el  
30 aislamiento, clonación y sobreexpresión en organismos transgénicos de un ADNc de un gen de origen vegetal que codifica para la actividad trehalosa-6-fosfato sintasa/fosfatasa, particularmente el gen *sl-tps/p* que codifica para la enzima bifuncional trehalosa-6-fosfato sintasa/fosfatasa (SL-TPS/P) de  
35 la planta de resurrección *Selaginella lepidophylla*. Dicha enzima permite obtener en plantas transgénicas niveles altos de trehalosa. Además, las plantas son tolerantes al calor, frío, salinidad y escasez de agua. La subclonación de dicho ADNc en vectores de expresión apropiados para transformar a otros

vectores de expresión apropiados para transformar a otros organismos tales como bacterias, levaduras y animales, permitirá la síntesis de trehalosa en dichos organismos confiriéndoles tolerancia al calor, frío, salinidad y escasez de agua. Por otro lado, el gen *sl-tps/p* se puede usar también para sintetizar cantidades masivas de trehalosa en microorganismos, células aisladas y organismos completos de plantas o animales, que hayan sido transformados con dicho gen.

10

**FIGURAS**

Figura 1. Estructura de la enzima SL-TPS/P de *S. lepidophylla*. El esquema muestra el tamaño a escala (en kD) de SL-TPS/P y su estructura con base en la similitud en la secuencia de aminoácidos con respecto a la TPS1 y a la TPS2 de levadura. Las rayas diagonales y la cuadrícula denotan las regiones similares

Figura 2. Mapa de restricción del ADNc del gen *sl-tps/p*. Los sitios de restricción de este mapa se confirmaron con la secuencia nucleotídica. En la parte superior del esquema se muestran los sitios de corte para las enzimas de restricción: Eco RI (R), Eco RV (E), Hind III (H), Sac I (Sc), Sal I (S). No hay sitios para las enzimas: Bam HI, Kpn I, Pst I, Sma I, Xba I. En la parte inferior del esquema se indica la longitud del ADNc en kb. El extremo 5' del ADNc se encuentra del lado izquierdo del esquema.

Figura 3. Representación esquemática del plásmido pIBT6. Las abreviaciones significan: Amp<sup>R</sup>, gen que confiere resistencia a ampicilina; lac Z, promotor del gen de la  $\beta$ -Galactosidasa; *sl-tps/p*, ADNc de la trehalosa-6-fosfato sintasa/fosfatasa; T3 y T7 son los promotores de los fagos T3 y T7 para la transcripción *in vitro*. El plásmido pIBT6 tiene un tamaño aproximado de 6150 pb. Las flechas indican la dirección de la transcripción.

Figura 4. Representación esquemática del vector de expresión pBN35. Las abreviaciones significan: RB y LB, bordes derecho e izquierdo, respectivamente, del T-ADN del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*; Kan<sup>R</sup>, gen que confiere resistencia a Kanamicina para seleccionar en *E. coli*; pNOS, promotor del gen de la nopalina sintasa; NPT II, gen que codifica para la neomicina fosfotransferasa y permite seleccionar células vegetales resistentes a la kanamicina; pA, señal poli-A; 35S,

vegetales resistentes a la kanamicina; pA, señal poli-A; 35S, promotor 35S del virus de la coliflor; SMC, sitio múltiple de clonación. El plásmido pBN35 tiene un tamaño aproximado de 12 kb. Las flechas indican la dirección de la transcripción.

- 5 Figura 5. Representación esquemática del plásmido pIBT36. Las abreviaciones significan: RB y LB, bordes derecho e izquierdo, respectivamente, del T-ADN del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*; Kan<sup>r</sup>, gen que confiere resistencia a Kanamicina para seleccionar en *E. coli*; pNOS, promotor del gen de la nopalina sintasa; NPT II, gen que codifica para la neomicina fosfotransferasa y permite seleccionar células vegetales resistentes a la kanamicina; pA, señal poli-A; 35S, promotor 35S del virus de la coliflor; *sl-tps/p*, ADNc de la trehalosa-6-fosfato sintasa/fosfatasa. El plásmido pIBT36 tiene un tamaño
- 10 aproximado de 15.2 kb. Las flechas indican la dirección de la transcripción.
- 15

#### DESCRIPCION DETALLADA

- En la siguiente descripción, se denomina como *sl-tps/p* al
- 20 ADNc que codifica para la enzima bifuncional trehalosa-6-fosfato sintasa/fosfatasa; SL-TPS/P es la enzima trehalosa-6-fosfato sintasa/fosfatasa; *sl-tps* es la secuencia que codifica para la trehalosa-6-fosfato sintasa; y SL-TPS es el polipéptido con actividad de trehalosa-6-fosfato sintasa.
- 25 Para aislar la clona *sl-tps/p* se hizo una comparación de las secuencias de aminoácidos de la trehalosa-6-fosfato sintasa, deducidas a partir de las secuencias de nucleótidos reportadas. Las secuencias utilizadas provienen de *E. coli*, EC-otsA [Kaasen, I., McDougall, J., Strom, A.R. (1994) *Gene* 145: 9-15];
- 30 *Schizosaccharomyces pombe*, SP-TPS1 [Blazquez, M.A., Stucka, R., Feldman, H. & Gancedo, C. (1994) *J. Bacteriol.* 176: 3895-3902]; *Aspergillus niger*, AN-TPS1 [Wolschek, M.F. & Kubicek, C.P. (1994) NCBI: Seq. ID 551471; no publicado]; *Saccharomyces cerevisiae*, SC-TPS1 [McDougall, J., Kaasen, I. & Strom, A.R. (1993) *FEMS Microbiol. Let.* 107: 25-30]; *Kluyveromyces lactis*, KL-GGS1 [Luyten, K., de Koning W., Tesseur, I., Ruiz, M.C., Ramos, J., Cobbaert, P., Thevelein, J.M., Hohmann, S. (1993) *Eur. J. Biochem.* 217: 701-713]. Con base en dicha comparación se seleccionaron regiones altamente conservadas para sintetizar
- 35

## II

seleccionaron regiones altamente conservadas para sintetizar oligonucleótidos degenerados, con los cuales se procedió a rastrear el banco de ADNc de *Selaginella lepidophylla*. Los oligonucleótidos sintetizados fueron TPS5'-1  
 5 (YTNTGGCCNBCNTTYCAYTAY), TPS5'-2 (GGNTKBTYYTNCAYAYNCCNTTYCC),  
 TPS5'-3 (MGNYTNGAYTAYWBNAARGGNB-TNCC), TPS3'-1  
 (SWNACNARRTTCATNCCRTCNCCK) y TPS3'-2 (CCRWANTKNCRCRTTDTATNCKNCC).

A partir de  $4 \times 10^6$  bacteriófagos recombinantes plateados de un banco de expresión de ADNc de *S. lepidophylla*, se obtuvieron  
 10 13 placas que hibridizaron con los oligonucleótidos TPS5'-1, TPS5'-3 y TPS3'-2. Estos 13 aislamientos de bacteriófago se  
 platearon de nuevo a distintas diluciones para obtener placas separadas. Solo en 6 casos se obtuvieron placas que hibridizaron  
 con los oligonucleótidos TPS5'-2 y TPS3'-1, además de  
 15 rehibridizar con la mezcla de TPS5'-1, TPS5'-3 y TPS3'-2. Una sola placa de cada uno de estos 6 distintos aislamientos se  
 utilizó para escindir el plásmido pBluescript SK (-) del bacteriófago. A partir de las colonias que crecieron en  
 ampicilina se extrajo ADN de plásmido y se cortó con las enzimas  
 20 Eco RI y Xho I para aislar el inserto correspondiente. Después de realizar un mapeo de restricción con diversas enzimas y por  
 medio de hibridización tipo Southern, se identificaron fragmentos de ADN que hibridizaron con los oligonucleótidos en  
 estas seis clonas. En seguida se seleccionó aquella clona que  
 25 contuvo el inserto de mayor tamaño (Figura 2) para crear delecciones y determinar su secuencia nucleotídica. Esta clona,  
 pIBT6 (Figura 3), fue la única que hibridizó con el oligonucleótido TPS5'-1, que corresponde al extremo  
 amino-terminal de la región de homología seleccionada para  
 30 aislar el ADNc.

La secuencia completa del inserto de la clona pIBT6 es de 3223 pb y se denomina *sl-tps/p* (SEQ ID NO: 1). Contiene un marco de lectura abierta de 2985 pb (incluyendo el codón de terminación) que codifica para un polipéptido denominado  
 35 SL-TPS/P (SEQ ID NO: 2) de 994 aminoácidos con un peso molecular de 109.1 kD. La secuencia incluye 32 nucleótidos de la cola de poli-A. Además, *sl-tps/p* contiene regiones 5' y 3' no traducidas de 110 pb y 96 pb, respectivamente. Todo lo anterior confirma que *sl-tps/p* es una clona completa de ADNc. El contexto del

codón de iniciación en SL-TPS/P corresponde al reportado en plantas [Lütcke, H.A., Chow, K.C., Mickel, F.S., Moss, K.A., Kern, H.F. & Scheele, G.A. (1987) EMBO J. 6: 43-48].

La región amino-terminal de 600 aminoácidos de SL-TPS/P  
5 tiene una identidad del 53% y similitud del 70% con la TPS1 de la levadura *Schizosaccharomyces pombe*, la cual consiste de 570 amino ácidos. Estos 600 aminoácidos constituyen per se una trehalosa-6-fosfato sintasa que aquí se denomina como SL-TPS (SEQ ID NO: 4) y *sl-tps* (SEQ ID NO: 3) a la región del ADNc que  
10 la codifica. Por otro lado, el alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos de SL-TPS/P con la secuencia de TPS2 proveniente de *S. cerevisiae* [De Virgilio, C., Bürckert, N., Bell, W., Jenö, P., Boller, T. & Weimken A. (1993) Eur. J. Biochem. 212: 315-323], reveló también una homología consistente  
15 en 29% de identidad y 52% de similitud. Cabe señalar que TPS1 y TPS2 de levadura comparten entre sí 33% de identidad. La similitud entre SL-TPS/P y TPS1 o entre la primera y TPS2, corresponde a regiones de aminoácidos altamente conservadas entre las distintas trehalosa-6-fosfato sintasas o fosfatasas de  
20 levadura, hongos y bacteria (Figura 1). El porcentaje de identidad de entre SL-TPS/P y TPS1 o TPS2 está dentro del rango esperado, dada la relación filogenética entre las plantas y hongos, para genes que codifican para polipéptidos con la misma función. Por ejemplo, si bien la secuencia deducida del gen  
25 *hsp101* de *Arabidopsis thaliana* al ser comparada con la del homólogo *hsp104* de levadura mostró solamente 43% de identidad, el gen de la planta es capaz de complementar a la mutante de levadura en dicho gen [Schirmer, E.C., Lindquist, S. & Vierling, E. (1994) Plant Cell 6: 1899-1909].

30 Se ha establecido que la similitud en la secuencia deducida en distintas proteínas, aún provenientes de especies no relacionadas filogenéticamente, es una evidencia de estructura similar y función relacionada o idéntica [Doolittle, R.F. (1995) Annu. Rev. Biochem. 64: 287-314]. Un criterio importante para  
35 determinar una estructura secundaria y función similar entre dos secuencias proteicas, es el patrón de hidrofobicidad [Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-132]. La enzima SL-TPS/P de *S. lepidophylla* y la TPS1 de levadura tienen un patrón de hidrofobicidad casi idéntico. Por todo lo mencionado

patrón de hidrofobicidad casi idéntico. Por todo lo mencionado anteriormente se concluye que la función de SL-TPS/P es la de una enzima bifuncional con actividades catalíticas de trehalosa-6-fosfato sintasa y trehalosa-6-fosfato fosfatasa.

5 La información hasta ahora disponible de la función de la trehalosa, hace suponer que este disacárido interviene activamente en la protección celular durante la sequía en *Selaginella*. Para corroborar que el ADNc *sl-tps/p* corresponde a un gen activo, se determinó el patrón de expresión de dicho gen  
10 utilizando geles tipo Northern, evaluando los niveles de transcrito específico en condiciones normales y de déficit hídrico. Para el análisis de la expresión del gen de *sl-tps/p* en un gel tipo Northern, en cada carril del gel se cargaron 2 µg de ARN polyA<sup>+</sup> extraído de micrófilas de *S. lepidophylla* hidratadas,  
15 deshidratadas durante 2.5 horas, 5 horas y un año. Como sonda se utilizó el ADNc *sl-tps/p* marcado radiactivamente con <sup>32</sup>P. En el autoradiograma se puede observar una banda de 3.2 kb presente tanto en las micrófilas hidratadas como en las deshidratadas a los diferentes intervalos. Este resultado demuestra una  
20 expresión constitutiva del gen de *sl-tps/p*, lo cual va de acuerdo con la observación hecha con anterioridad por otros autores [Adams, R.P., Kendall, E. & Kartha, K.K. (1990) *Biochem. Systematics & Ecology* 18: 107-110] donde se encontró la presencia de trehalosa en niveles relativamente comparables,  
25 tanto en plantas hidratadas como deshidratadas. A diferencia de *E. coli* y levadura, en *S. lepidophylla* la expresión de la trehalosa-6-fosfato sintasa/fosfatasa no se induce por efecto del estrés osmótico o calórico sino que se mantiene constante independientemente del estatus hídrico de la planta. Por  
30 consiguiente, la correlación en la expresión constitutiva del gen de *sl-tps/p* con la presencia de trehalosa en *Selaginella* hace suponer que la enzima no se ve modificada en su actividad, en contraste con lo que sucede en levadura donde la actividad de la enzima esta sujeta a regulación por fosforilación y sustrato  
35 [Panek, A.C., de Araujo, P.S., Neto, M.V. & Panek, A.D. (1987) *Curr. Genet.* 11: 459-465; Thevelein, J.M. & Hohmann, S. (1995) *Trends Biochem. Sci.* 20: 3-10].

Para determinar el número de copias del gen *sl-tps/p* en el

genoma de *S. lepidophylla*, se realizó un Southern genómico. En el gel se cargaron en cada carril 20 µg de ADN genómico de *S. lepidophylla* cortado con las siguientes enzimas de restricción: Eco RI, Xba I o Bam HI. Como sonda se utilizó el ADNc de *sl-tps* 5 marcado radiactivamente con <sup>32</sup>P. En el autoradiograma de dicho experimento se observan dos bandas, una de 1.6 y otra 6 kb al cortar el ADN con la enzima Eco RI; una banda de 9 kb al cortar con Xba I; y dos bandas de 11 y 12 kb al digerir el ADN con Bam HI. Este experimento sugiere que el gen de *sl-tps/p* se encuentra 10 como copia única en el genoma de *S. lepidophylla*. Por lo tanto, el gen de *sl-tps/p* de esta planta parece ser el único responsable de la síntesis de trehalosa, la cual corresponde aproximadamente al 80% de los carbohidratos solubles en *S. lepidophylla*.

15 Para obtener plantas que sinteticen trehalosa, en primer lugar se subclonó el ADNc de *sl-tps/p* s en el vector de expresión pBN35 (Figura 4), para dar lugar al plásmido pIBT36 (Figura 5). El vector pBN35 permite expresar cualquier gen bajo el control del promotor 35S del virus CaMV de la coliflor 20 [Guilley, H., Dudley, K., Jonard, G., Richards, K., & Hirth, L. (1982) Cell 21: 285-294] que es un promotor fuerte y constitutivo. El plásmido pIBT36 se utilizó para obtener plantas de tabaco, transformadas por medio del sistema de *Agrobacterium*, que al regenerar fueran capaces de producir trehalosa. Esta 25 construcción se puede expresar en cualquier planta que pueda ser transformada, utilizando el sistema de *Agrobacterium* o por cualquier otro método que sea conocido en el estado del arte. A partir de 31 plantas transgénicas obtenidas se detectó la expresión del ADNc de *sl-tps/p* en 16 plantas, utilizando geles 30 tipo Northern. En 10 de estas plantas se detectó la presencia de trehalosa a niveles altos, la cual correlacionó con la actividad de trehalosa-6-fosfato sintasa. No se detectó la presencia de trehalosa ni actividad de la enzima en plantas no transformadas o transformadas solo con el vector pBN35.

35 La trehalosa como aditivo en alimentos y para la conservación de biomoléculas y otras sustancias de interés médico, podrá ser obtenida a un precio más atractivo mediante su producción masiva en organismos transgénicos, como levaduras y



producción masiva en organismos transgénicos, como levaduras y plantas transgénicas. Para poder lograrlo se requiere obtener altos niveles de trehalosa en el tejido vegetal, a fin de reducir los costos de extracción y purificación. La presente invención da lugar a una estrategia para la producción masiva de trehalosa en plantas que incluye la transformación con el ADNc de *sl-tps/p* o de *sl-tps* (en construcciones adecuadas) de plantas de tabaco, que además de ser uno de los modelos vegetales más trabajados en la biología molecular tiene una gran superficie foliar que se presta para la producción de grandes volúmenes de trehalosa, y plantas de papa, que es el cultivo con mayor rendimiento de biomasa por hectárea, que a la vez, siendo la papa un producto de consumo natural del hombre, daría lugar a trehalosa con una mayor aceptación tanto por el público como por los organismos normativos. Es obvio para un experto en el estado del arte que el ADNc *sl-tps/p* o el fragmento del ADNc *sl-tps* de la presente invención no quedan restringidos a las plantas de tabaco y papa, sino que pueden ser empleados en la transformación de cualquier otra planta.

Como ya se ha mencionado, existen serias limitantes de tipo metabólicas para la producción de altos niveles de trehalosa en levaduras. La presente invención proporciona una manera de obviar estos problemas, mediante el uso del ADNc de *sl-tps/p* o de *sl-tps* en construcciones adecuadas que involucren vectores integrativos Yip o multicopia, aprovechando que como ya se dijo anteriormente, que la SL-TPS/P no parece tener un mecanismo de regulación postraducciona l o metabólico que limite su actividad enzimática y además que es capaz de dirigir la producción de altos niveles de trehalosa. Esto permitirá no solo la producción masiva de trehalosa, sino también mejorará los rendimientos de las levaduras en la panificación y en las fermentaciones alcohólicas de la cerveza y el vino.

Los cereales que constituyen la base de la alimentación mundial como el arroz, trigo y maíz, las leguminosas así como otras plantas como el tabaco, el cual es utilizado preferentemente en la descripción de la presente, podrían ser cultivados bajo condiciones climáticas desfavorables, mediante el empleo de las plantas transgénicas correspondientes, capaces de producir trehalosa como respuesta al frío, calor, salinidad o

de producir trehalosa como respuesta al frío, calor, salinidad o sequía, o en forma constitutiva y con ello de resistir las condiciones ambientales adversas. La presente invención provee un medio para lograr tal resistencia, a través del empleo del 5 ADNc de *sl-tps/p* o *sl-tps* en construcciones que contengan ya sea promotores constitutivos o promotores que induzcan su expresión solo bajo estrés. Los productos cosechados, además de haberse cultivado en condiciones donde normalmente no se hubieran logrado, podrán ser almacenados por períodos más largos o bajo 10 condiciones extremas a diferencia de los productos obtenidos con plantas no transformadas.

Las propiedades de resistencia al estrés por frío, calor y sequía que la trehalosa confiere a los tejidos que la contienen, permitirán que, mediante el empleo del ADNc de *sl-tps/p* o de *sl-tps* 15 en la transformación con vectores que incluyan promotores constitutivos, tejido-específicos u órgano-específicos, se produzcan órganos o tejidos para la reproducción, tales como polen, tubérculos, semillas y flores que podrán ser conservados por períodos más largos con una mayor viabilidad, lo que 20 constituiría una gran ayuda para programas de fitomejoramiento y conservación del germoplasma.

## MATERIAL Y MÉTODOS DE LA DESCRIPCIÓN

### Material

25 Los reactivos utilizados fueron de grado analítico marca Baker o Sigma. Las enzimas de restricción y modificación fueron de marca Boehringer-Mannheim. El kit de síntesis de ADNc ZAP, el vector Uni-ZAP XR y los extractos de empaquetamiento Gigapack II Gold fueron de Stratagene Cloning Systems (EEUU). El kit 30 Sequenase Version 2.0 para determinar la secuencia nucleotídica fue de United States Biochemical Corporation (EEUU).

La planta de resurrección *Selaginella lepidophylla* (Hook. & Grev.) Spring. se colectó deshidratada en suelos rocosos de zonas áridas en los Estados de Morelos y Oaxaca de la República 35 Mexicana. Posteriormente fue cultivada en condiciones controladas (24°C y 16 h. de luz con 50% de humedad promedio) en cámaras de crecimiento Conviron o en el invernadero. Las plantas se regaron cada tercer día con un volumen de agua de 20 ml para macetas de 2 L. Para someter a estrés hídrico a *S. lepidophylla*,

macetas de 2 L. Para someter a estrés hídrico a *S. lepidophylla*, la planta completa o frondas de micrófilas, se secaron al aire colocándolas sobre papel filtro Whatman 3MM. A partir de este momento se determinó el tiempo de deshidratación.

5

#### Cepas

El banco de ADNc se plateó en la cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF' y la cepa SOLR se utilizó para escindir al pBluescript del fago lambda tal y como se describe en el manual del "ZAP-cDNA  
10 Synthesis Kit" [Stratagene Cloning Systems, Calif., EEUU; # catálogo 200400, 200401 y 2004029]. La cepa de *E. coli* DH5 alfa se utilizó para subclonar y hacer construcciones. La cepa de *A. tumefaciens* LBA4404 se utilizó para transformar tabaco y la cepa de *E. coli* HB101, portando el plásmido pRK2013 [Bevan, M.  
15 (1984) Nucl. Acids Res. 22: 8711-8721], se utilizó para movilizar el plásmido pIBT36 de *E. coli* a *A. tumefaciens* por medio de conjugación triparental tal como se ha descrito anteriormente [Bevan, M. (1984) Nucl. Acids Res. 22: 8711-8721].

#### 20 Manipulación del ADN

Las técnicas de ADN recombinante tales como la transformación bacteriana, el aislamiento de ADN de plásmido y bacteriófago lambda, se llevaron a cabo de acuerdo a procedimientos estándar [Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis,  
25 T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York]. El marcaje de fragmentos radiactivos se realizó por la técnica de "random-priming" con oligonucleótidos [Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1983) Anal. Biochem. 132: 6-13].

30

#### Construcciones

El vector de expresión pBN35 es un derivado de pBin19 [Bevan, M. (1984) Nucl. Acids Res. 22: 8711-8721], que se construyó subclonando los 850 pb del promotor 35S del virus CaMV  
35 de la coliflor [Guilley, H., Dudley, K., Jonard, G., Richards, K., & Hirth, L. (1982) Cell 21: 285-294] entre los sitios Hind III y Sal I de pBin19, y el fragmento de 260 pb que constituye la señal de poli-adenilación del gen de la nopalina sintetasa del T-ADN [Bevan, M., Barnes, W. & Chilton, M.-D. (1983) Nucl.

del T-ADN [ Bevan, M., Barnes, W. & Chilton, M.-D. (1983) Nucl. Acids Res. 11: 369-385], en los sitios Sac I y Eco RI del mismo vector (Figura 4).

El plásmido pIBT36 (Figura 5) se construyó subclonando el 5 ADNc *sl-tps/p* en los sitios Bam HI y Kpn I del vector de expresión pBN35.

Construcción del banco de ADNc de *S. lepidophylla*

Para aislar las clonas de ADNc se preparó un banco de expresión, a partir de ARNm aislado de micrófilas de *S. lepidophylla* deshidratadas durante 2.5 h., utilizando el kit de síntesis de ADNc ZAP, el vector Uni-ZAP XR y los extractos de empaquetamiento Gigapack II Gold, siguiendo paso a paso el manual de laboratorio "ZAP-cDNA Synthesis Kit" provisto por el fabricante [Stratagene Cloning Systems, Calif., EEUU; # catálogo 15 200400, 200401 y 2004029]. El ARN polyA se extrajo de las micrófilas de *S. lepidophylla*, deshidratadas durante 2.5 h., de acuerdo a un método conocido [Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Anal. Biochem. 162: 156-159]. El título inicial del banco fue de  $2 \times 10^6$  placas de bacteriófago/ml y después de 20 amplificarlo fue de  $1.5 \times 10^8$  placas de bacteriófago/ml.

El plásmido pBluescript SK (-) se escindió del bacteriófago por medio de la técnica conocida como "zapping" de acuerdo al Manual de laboratorio "ZAP-cDNA Synthesis Kit" [Stratagene Cloning Systems, Calif., EEUU; # catálogo 200400, 200401 y 25 2004029].

#### Secuenciación del ADN

A partir de la clona seleccionada, se procedió a crear delecciones consecutivas del inserto con las enzimas Exo III y 30 Nucleasa S1 [Henikoff, S. (1984) Gene 28: 351-359], para posteriormente determinar su secuencia nucleotídica por el método de terminación de la cadena con dideoxinucleótidos [Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467].

35 Para analizar la secuencia del ADN se utilizó el paquete de software de la University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWCGC) [Devereux, J. Haeberli, P. & Smithies, O. (1984) Nucl. Acids Res. 12: 387-395]. Las gráficas de hidrofobicidad se obtuvieron por un programa conocido [Kyte, J. & Doolittle, R.F.

obtuvieron por un programa conocido [Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-132] y los alineamientos de secuencias de proteínas con el programa BESTFIT del paquete UWGCG.

5

#### Hibridación de ácidos nucleicos

Para el tamizado del banco, las placas de bacteriófago se transfirieron a una membrana de nylon Hybond N<sup>+</sup> (Amersham Life Sciences), la cual se trató de acuerdo al método convencional para desnaturalizar el ADN [Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York]. El filtro se hibridizó con los oligonucleótidos, marcados con el isótopo <sup>32</sup>P por medio de la polinucleótido cinasa, utilizando 6 x SSC (1 x SSC= 0.15 M de NaCl y 0.015 M de citrato de sodio) a 37°C. Se realizaron tres lavados del filtro, durante 20 minutos cada uno a la misma temperatura, a las siguientes condiciones : 6 x SSC; 4 x SSC; y 2 x SSC.

Las técnicas de gel y transferencia tipo Southern y Northern se realizaron de acuerdo a protocolos estándar [Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York], con las siguientes modificaciones. Para el Southern genómico se fraccionó el ADN en un gel de agarosa al 0.8 % en buffer TBE y se transfirió a una membrana de nylon Hybond N<sup>+</sup> (Amersham Life Sciences). El filtro se hibridizó utilizando como sonda al ADNc *sl-tps/p* marcada con el isótopo <sup>32</sup>P, utilizando 2 x SSC (1 x SSC= 0.15 M de NaCl y 0.015 M de citrato de sodio) a 65°C. Se realizaron tres lavados del filtro, durante 20 min. cada uno a la misma temperatura, a las siguientes condiciones : 2 x SSC; 1 x SSC; y 0.5 x SSC. En el Northern se utilizó un gel de agarosa al 1.2% en buffer MOPS-formaldehído y para la transferencia se utilizó también una membrana de nylon Hybond N<sup>+</sup>. Las condiciones de hibridación fueron en 50% de formamida y 2 x SSC a 42°C. Los tres lavados sucesivos del filtro se hicieron con 2 x SSC, 2 x SSC y 1 x SSC, respectivamente a 55°C.

20

Transformación de tabaco

La transformación de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. SR1) se llevó a cabo por el método de discos de hoja [Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T. 5 (1985) *Science* 227: 1229-1231], utilizando a *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 que contenía el plásmido pIBT36. Los discos de hoja se cultivaron en cajas Petri conteniendo medio MS con vitaminas [Murashige, T. & Skoog, F. (1962) *Physiol. Plant.* 15: 473-497], hormonas (0.1 ppm de NAA y 1 ppm de BAP) y 10 antibióticos (100 µg/ml de kanamicina y 200 µg/ml de carbenicilina) para regenerar brotes en 4 a 6 semanas. Posteriormente, los brotes se transfirieron a frascos Magenta conteniendo medio MS (100 µg/ml de kanamicina y 200 µg/ml de carbenicilina) sin hormonas ni vitaminas, para la formación de 15 raíz en 2 a 3 semanas más. Las plantas regeneradas se transfirieron a macetas con tierra y se crecieron en cámaras de cultivo (a 24°C con 16 horas de luz) para obtener plantas fértiles al cabo de 4 a 6 semanas.

20 Determinación de trehalosa

La trehalosa se determinó por el método degradativo con trehalasa [Araujo, P.S., Panek, A.C., Ferreira, R. & Panek, A.D. (1989) *Anal. Biochem.* 176: 432-436]. Para obtener azúcares solubles se molieron 500 mg de tejido fresco o 50 mg de tejido 25 seco (congelado en nitrógeno líquido), en 0.5 ml de buffer PBS 100 mM a pH 7.0, en un homogeneizador para tubos de microcentrífuga. Se agregaron 4 volúmenes de etanol absoluto e hirvieron las muestras 10 minutos en tubos con rosca para evitar evaporación. Posteriormente, se centrifugó en tubos de 30 microcentrífuga, 2 minutos a 13,000 rpm para recuperar el sobrenadante. Se reextrajo de nuevo con el mismo volumen de etanol al 80% y se secó la pastilla al vacío. Las muestras se resuspendieron en 0.250 ml de PBS 50mM a pH 6.5.

Para la determinación de trehalosa, se tomaron de 10 a 30 35 µl de extracto, se añadieron 4 µl (c.a. 15 mU) de trehalasa (Sigma no. cat. T-8778) y se incubó por 2 hrs a 30 °C. Como control negativo se puso un tubo con extracto pero sin trehalasa y como control positivo se puso un tubo con trehalosa pura

(Sigma no. cat. T-3663). Se llevó el volumen a 0.5 ml con PBS 50 mM, pH 7.0 y se añadieron 0.5 µl de glucosa oxidasa y peroxidasa del kit Sigma no. cat. 510-A, para la determinación de glucosa. Se incubó 40 min a 37 °C y se determinó la densidad óptica a 425 nm inmediatamente. Para calcular la concentración de glucosa, se utilizó una curva estándar de glucosa con valores entre 0 a 75 mM. Se restaron los valores de los tubos sin trehalasa de los tratados con esta enzima para calcular la cantidad de trehalosa, tomando en cuenta que 1 mol de glucosa es 1/2 mol de trehalosa.

10

#### Determinación de la actividad enzimática.

Para determinar la actividad de la trehalosa-6-fosfato sintasa, se siguió un método reportado [Londesborough, J. & Vuorio. O. (1991) J. Gen. Microbiol. 137: 323-330] que básicamente consiste en un ensayo acoplado midiendo la extinción molar de NADH a 340 nm. La reacción se realiza en un volumen de 100µl que contienen 40 mM de buffer HEPES/KOH pH 6.8, 10 mM de glucosa-6-fosfato, 5 mM de UDP-glucosa, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino. La reacción se incubó 10 min a 30°C y se detiene hirviendo la muestra 2 min. Después de enfriar el tubo, se añaden 900 µl conteniendo 40 mM de buffer HEPES/KOH pH 6.8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 µg/ml de fosfoenolpiruvato, 0.24 mM de NADH, 3.5 unidades de piruvato cinasa y 5 unidades de lactato deshidrogenasa (sigma No. Cat. P-0294). Se midió espectrofotométricamente la desaparición de NADH a 340 nm incubando a las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Para determinar la actividad específica de la trehalosa-6-fosfato sintasa, se midió la concentración de proteína por medio del método de Bradford [Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72: 248-254].

Los siguientes ejemplos son para ilustrar de manera detallada la presente invención y de ninguna manera constituyen una limitante para aplicar esta invención. La información de la presente invención permite producir trehalosa por medio de técnicas de ADN recombinante en células u organismos transformados con la clona *sl-tps/p* de ADNc. Los métodos de transformación y vectores apropiados para ser utilizados en

microorganismos y plantas, son conocidos por aquellas personas familiarizadas con el estado del arte.

### Ejemplo 1

5

#### Aislamiento del ADNc de *sl-tps/p*

Se colectaron plantas de resurrección *Selaginella lepidophylla* deshidratadas de suelos rocosos de zonas áridas en los Estados de Morelos y Oaxaca de la República Mexicana. Posteriormente fueron cultivadas en macetas de 2L a 24°C con 16 hr de luz y una humedad promedio de 50% en cámaras de crecimiento Conviron. Las plantas se regaron cada tercer día con 20 ml de agua.

Para aislar las clonas de ADNc se preparó un banco de expresión, a partir de 5 µg de ARNm aislado de 50 g de micrófilas de *S. lepidophylla* deshidratadas durante 2.5 hr. Después de sintetizar el ADNc, se clonó utilizando 1µg del vector Uni-ZAP XR. Los bacteriófagos se empaquetaron *in vitro* y posteriormente se tamizaron con una mezcla de oligonucleótidos degenerados que codifican para regiones consenso en la trehalosa-6-fosfato sintasa y fosfatasa de las secuencias reportadas de *E. coli* y levadura. Una de las clonas aisladas corresponde a un ADNc (*sl-tps/p*) con la región codificadora completa. El análisis de la secuencia de aminoácidos deducida, resultó en una identidad de 53% para la trehalosa-6-fosfato sintasa y 29% de identidad para la trehalosa-6-fosfato fosfatasa, comparativamente a secuencias reportadas de trehalosa-6-fosfato sintasa de bacteria y diversas levaduras. La homología de la proteína codificada por *sl-tps/p*, denominada SL-TPS/P con la trehalosa-6-fosfato sintasa, mapea en la región N-terminal de la primera y la homología de SL-TPS/P con la trehalosa-6-fosfato fosfatasa se encuentra a lo largo de toda la secuencia (Fig. 1).

35

### Ejemplo 2

#### Construcción de organismos transgénicos

Las células de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. SR1) se transformaron por el método de discos de hoja, utilizando *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 que contenía el plásmido pIBT36. Los discos de hoja se cultivaron en cajas Petri



23

conteniendo medio MS con vitaminas, 0.1 ppm de NAA, 1 ppm de BAP, 100µg/ml de kanamicina y 200 µg/ml de carbenicilina para regenerar brotes en 4 a 6 semanas. Los brotes se transfirieron a medio MS con 100 µg/ml de kanamicina y 200 µg/ml de cabenicilina 5 sin hormonas ni vitaminas, para la formación de raíz en 2 a 3 semanas más. Las plantas regeneradas se transfirieron a cámaras de cultivo a 24°C y con 16 horas de luz para obtener plantas fértiles al cabo de 4 a 6 semanas.

De un total de 31 plantas transgénicas obtenidas se detectó 10 en 16 de ellas, utilizando geles tipo Northern, la expresión del ADNc de *sl-tps/p*. En 10 de estas plantas se encontró la presencia de trehalosa a niveles altos, la cual correlacionó con la actividad de trehalosa-6-fosfato sintasa. No se detectó la presencia de trehalosa ni actividad de la enzima en plantas no 15 transformadas o en aquellas transformadas solo con el vector pBN35.

### Ejemplo 3

#### Mejoramiento en la síntesis de trehalosa en levadura

20 Existe clara evidencia de que la presencia de glucosa causa disminución en la síntesis de trehalosa en levadura [Thevelein, J.M. & Hohmann, S. (1995) Trends Biochem. Sci. 20: 3-10]. Esto parece deberse a modificaciones postraduccionales de la TPS1 y una posible regulación negativa de la transcripción en el gen de 25 dicha enzima [Panek, A.C., de Araujo, P.S., Neto, M.V. & Panek, A.D. (1987) Curr. Genet. 11: 459-465]. Lo anterior constituye una seria limitante en la producción masiva de trehalosa en levadura. A continuación se propone un método para obtener niveles altos de trehalosa en levadura, sin fluctuaciones debido 30 a represión catabólica.

Se requiere de cepas de *S. cerevisiae* que tengan marcadores auxotróficos tales como *his3*, *leu2*, *ura3*, etc., que permitan la selección por transformación con los vectores integrativos YIp [Orr-Weaver, T.L., Szostak, J.W. & Rothstein, R.S. (1983) 35 Methods in Enzymol. 101: 228-245]. Estos vectores pueden ser contruidos por una persona que esté familiarizada con el estado del arte. El vector integrativo se basa en la recombinación homóloga del marcador, presente en el genoma de la levadura, con

fragmentos 5' y 3' del mismo gen, que deben flanquear a la región de ADN que se desea integrar en el genoma de la levadura.

En primer lugar, se debe subclonar el ADNc de la *sl-tps/p* en un vector de *E. coli*, de manera que el ADNc de la *sl-tps/p* 5 esté bajo el control de un promotor fuerte de un gen de levadura que no este sujeto a regulación metabólica [Romanos, M.A., Scorer, C.A. & Clare, J.J. (1992) *Yeast* 8: 423-428]. Asimismo la construcción deberá contener una señal de terminación de la transcripción (ter) que quede localizada en el extremo 3' del 10 ADNc de la *sl-tps/p*. Esta fusión, promotor/ADN de *sl-tps/p/ter*, se subclona en un vector YIp que contenga las regiones 5' y 3' del gen *ura3*, de manera que la fusión quede integrada entre estas, además del gen marcador *leu2*. La construcción resultante se transforma en una cepa de levadura con genotipo *ura3'* y *leu2'*, 15 para seleccionar las recombinantes adecuadamente. La integración de la construcción en el genoma se confirma también por hibridación tipo Southern, de acuerdo al patrón de restricción conocido de los fragmentos de ADN involucrados. Una vez caracterizada la cepa recombinante en medio selectivo, se puede 20 crecer en un medio convencional, ya que la integración en el cromosoma de la construcción, evita la estricta necesidad de medio selectivo que se requiere cuando se usan vectores episomales para la expresión de genes exógenos en levadura [Stearns, T., Ma, H. & Botstein, D. (1990) *Methods in Enzymol.* 25 185: 280-291]. Esta particularidad en el diseño de esta cepa recombinante, tiene impacto económico para el escalamiento de un proceso biotecnológico ya que el medio selectivo es mucho más caro que el convencional.

La innovación aquí descrita consiste en que la cepa 30 recombinante de *S. cerevisiae* expresará la enzima SL-TPS/P a altos niveles con la subsecuente sobreproducción de trehalosa por encima de lo logrado hasta ahora por aquellas personas familiarizadas con el estado del arte, ya que la actividad de SL-TPS/P no está sujeta a regulación postraducciona. La 35 síntesis de trehalosa a altos niveles en la levadura redundará en mejorar el rendimiento en la panificación y en las fermentaciones alcohólicas de la cerveza y el vino. Además, la trehalosa obtenida por este método se puede purificar para otros

usos industriales tales como preservador de alimentos o biomoléculas.

#### Ejemplo 4

##### 5 Síntesis masiva de trehalosa en plantas transgénicas de papa y tabaco

La ingeniería genética ha posibilitado expresar casi cualquier gen en un organismo heterólogo. Las plantas transgénicas pueden utilizarse como biorreactores para producir en escala masiva compuestos de interés comercial que normalmente solo se obtienen en cantidades limitadas, tales como plásticos biodegradables, diversos carbohidratos, polipéptidos de uso farmacéutico y enzimas de uso industrial [Goddijn, O.J.M. & Pen, J. (1995) Trends Biotech. 13: 379-387]. Existen diversos métodos reportados para transformar plantas superiores, incluyendo a los cultivos de mayor importancia económica [Walden, R. & Wingender, R. (1995) Trends Biotech. 13: 324-331]. La transformación del tabaco [Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T. (1985) Science 227: 1229-1231] y papa [Sheerman, S. & Bevan, M.W. (1988) Plant Cell Rep. 7: 13-16] se lleva a cabo eficientemente utilizando el sistema de *Agrobacterium tumefaciens* y dicha técnica puede ser montada en el laboratorio por personas con un dominio en el estado del arte. Las construcciones para la expresión en plantas del ADNc de la *sl-tps/p*, se pueden hacer en un vector derivado del plásmido Ti que carezca de los genes tumorogénicos del T-ADN y que contenga un marcador de selección para las plantas transformadas que confiera, por ejemplo, resistencia a la kanamicina [Bevan, M. (1984) Nucl. Acids Res. 22: 8711-8721]. Además, deberá seleccionarse un promotor adecuado, dependiendo del uso que se requiera dar a las plantas transgénicas. Como señal de poli-adenilación se puede utilizar la del gen de la nopalina sintetasa del T-ADN [Bevan, M., Barnes, W. & Chilton, M.-D. (1983) Nucl. Acids Res. 11: 369-385].

Por ejemplo, si se planea sobreproducir trehalosa para uso industrial, se puede utilizar una planta como *Solanum tuberosum* que almacena una gran cantidad de carbohidratos en el tubérculo que es un órgano especializado conocido comunmente como papa. En términos de la biomasa aprovechable de una planta, la papa

términos de la biomasa aprovechable de una planta, la papa representa uno de los cultivos más productivos por unidad de área [Johnson, V.A. & Lay, C.L. (1974) *Agric. Food Chem.* **22**: 558-566]. Existen promotores fuertes y específicos del 5 tubérculo, como el del gen de la patatina-clase 1 [Bevan, M., Barker, R., Goldsbrough, A., Jarvis, M., Kavanagh, T. & Iturriaga, G. (1986) *Nucl. Acids Res.* **14**: 4625-4638; Jefferson, R., Goldsbrough, A. & Bevan, M. (1990) *Plant Mol. Biol.* **14**: 995-1006] que podrían utilizarse para producir grandes 10 cantidades de trehalosa. La conveniencia de utilizar a la papa como un sistema para sobreproducir trehalosa, es que el tubérculo de esta planta es un alimento humano por lo que la trehalosa proveniente de este órgano sería fácilmente aceptado por el consumidor.

15 El tabaco como sistema para sobreproducir trehalosa, con el fin de utilizar a ésta como aditivo en alimentos desecados, podría no tener aceptación en el mercado por posibles contaminantes, tales como la nicotina, que pudieran obtenerse al purificar la trehalosa. La trehalosa sobreproducida en el tabaco 20 podría utilizarse para preservar biomoléculas de uso industrial, tales como las enzimas de restricción y modificación [Colaço, C., Sen, S., Thangavelu, M., Pinder, S. & Roser, B. (1992) *Bio/Technology* **10**: 1007-1111]. Para la sobreexpresión de trehalosa en tabaco, se utilizaría el plásmido pIBT36 en donde 25 el gen *sl-tps/p* está bajo el control del promotor 35S del virus de la coliflor [Guilley, H., Dudley, K., Jonard, G., Richards, K., & Hirth, L. (1982) *Cell* **21**: 285-294].

#### Ejemplo 5

#### 30 Plantas transgénicas de cereales resistentes al estrés ambiental

Los cereales que constituyen la base de la alimentación mundial, podrían ser cultivados en condiciones climáticas desfavorables, si producen trehalosa como respuesta al frío, calor, salinidad o sequía. Para lograr esto, se requiere 35 expresar al ADNc de la *sl-tps/p* bajo el control de promotores que se induzcan por cualquiera de estos factores ambientales [Baker, S.S., Wilhelm, K.S. & Thomashow, M.F. (1994) *Plant Mol. Biol.* **24**: 701-713; Takahashi, T., Naito, S. & Komeda, Y. (1992) *Plant J.* **2**: 751-761; Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K.

Plant J. 2: 751-761; Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (1994) Plant Cell 6: 251-264]. La síntesis de trehalosa, solo bajo condiciones de estrés, evitaría que la producción continua de trehalosa (utilizando un promotor constitutivo) desvíe el 5 metabolismo de los carbohidratos y que como consecuencia disminuya la calidad y productividad de los granos. Existen reportes para la transformación del maíz [D'Halluin, K., Bonne, E., Bossut, M., De Beuckeleer, M. & Leemans, J. (1992) Plant Cell 4: 1495-1505], cebada [Wan, Y. & Lemaux, P.G. (1994) Plant 10 Physiol. 104: 37-48], trigo [Vasil, V., Castillo, A.M., Fromm, M.E. & Vasil, I.K. (1992) Bio/Technology 10: 667-674] y arroz [Shimamoto, K., Terada, R., Izawa, T. & Fujimoto, H. (1989) Nature 338: 274-276]. Esta metodología puede ser implementada por una persona que esté familiarizada con el estado del arte.

15

#### Ejemplo 6

##### Frutos de plantas transgénicas con mayor vida de anaquel

Diversos frutos, tales como el tomate, mango y plátano, maduran rápidamente y están expuestos a la putrefacción antes de 20 llegar a manos del consumidor. La cosecha temprana de los frutos y su almacenamiento refrigerado o en cámaras de ambiente controlado, se ha utilizado tradicionalmente para evitar el problema mencionado. Sin embargo, estos métodos son costosos, especialmente si se requiere transportar los frutos a sitios 25 lejanos. Para aumentar la vida de anaquel en el tomate, se ha reportado un retardamiento en su maduración utilizando plantas transgénicas que expresan en antisentido al gen de la poligalacturonasa, la cual interviene en la maduración del fruto [Smith, C.J.S., Watson, C.F., Ray, J., Bird, C.R., Morris, P.C., 30 Schuch, W. & Grierson, D. (1988) Nature 334: 724-726]. A pesar de este retardamiento en la maduración, subsiste el problema de que después de cierto tiempo este proceso se lleva a cabo sin que necesariamente el producto haya llegado al consumidor en buen estado.

35 Como alternativa a este método, aquí se propone producir trehalosa en plantas transgénicas de tomate, mango y plátano. Por ejemplo, utilizando un promotor específico del fruto del tomate [Bird, C.R., Smith, C.J.S., Ray, J.A., Moureau, P., Bevan, M.W., Bird, A.S., Hughes, S., Morris, P.C., Grierson, D.,

Bevan, M.W., Bird, A.S., Hughes, S., Morris, P.C., Grierson, D., Schuch, W. (1988) *Plant Mol. Biol.* 11: 651-662] se podría sobreexpresar a la SL-TPS para que la trehalosa se acumule específicamente en dicho órgano. El método de transformación y  
5 regeneración para plantas de tomate [McCormick, S., Niedermeyer, J., Fry, J., Barnason, A., Horsch, R., Fraley, R. (1986) *Plant Cell Rep.* 5: 81-84] se puede llevar a cabo por cualquier persona que conozca el estado del arte. Los tomates u otros frutos podrían cosecharse maduros para entonces ser sometidos completos  
10 o en partes a desecación y preservarse durante largos períodos sin necesidad de refrigeración. Al rehidratarse, los frutos tendrían las propiedades organolépticas normales que el consumidor demanda. En principio, la estrategia descrita con anterioridad se puede implementar para otros frutos siempre y  
15 que se disponga de un sistema de regeneración y transformación para la planta de interés y que se cuente con un promotor apropiado.

La producción de polen con viabilidad prolongada sería de

R., Goldsbrough, A. & Bevan, M. (1990) Plant Mol. Biol. 14: 995-1006] y semilla-específicos [Colot, V., Robert, L.S., Kavanaugh, T.A., Bevan, M.W. & Beachy, R.N. (1988) EMBO J. 7:297-302], que podrían ser utilizados para construir genes híbridos para la expresión de trehalosa en plantas.

## LISTADO DE SECUENCIAS

Número de Secuencias: 4

INFORMACION PARA SEQ ID NO: 1

## 10 I. CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 3223 pares de bases

(B) TIPO: ácidos nucleicos

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGIA: lineal

## 15 II. TIPO DE MOLECULA: ADNc para ARNm

III. HIPOTETICA: no

IV. ANTI-SENTIDO: no

VI. FUENTE ORIGINAL:

30

## IX. CARACTERISTICAS:

(A) NOMBRE: sitio poli-A

(B) LOCALIZACION: de 3192 a 3223 pares de bases

5 AGTGGCGATG GTGGCCATGG TTTGCTGAAT TTGTATTIAG TTAAATTGTT TTTTGCTGCG 60  
 GGC GG GTGT TTTTTC TCTGCTGCGC CGCGTGC GTG TGCAATACCT ATG CCT CAG 119  
 Met Pro Gln  
 1  
 CCT TAC CCT TCT TCC TCA TCC ACA AGC AAT GCC AAG GAG GCA GGA GGA 167  
 10 Pro Tyr Pro Ser Ser Ser Ser Thr Ser Asn Ala Lys Glu Ala Gly Gly  
 5 10 15  
 GGC GCT GCG GCG GCG GGG GGC GGC GGC GGC GGC GCC TTC AGC TTG CCG 215  
 Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Phe Ser Leu Pro  
 20 25 30 35  
 15 CCG TCG CTA GCA TCA TCG CGA GTG GAG CGC CTG GTG CGT GAG AGG CAG 263  
 Pro Ser Leu Ala Ser Ser Arg Val Glu Arg Leu Val Arg Glu Arg Gln  
 40 45 50  
 CTG CGG AAT CAA AGG CAG GAG GAT GAA CCT GAG GAT GAG CAG CAG GCG 311  
 Leu Arg Asn Gln Arg Gln Glu Asp Glu Pro Glu Asp Glu Gln Gln Ala  
 20 55 60 65  
 359



		31																	
		180				185				190				195					
		CTT	TGG	CCG	CTT	TTC	CAC	TAC	ATT	GGT	CTT	AGG	CAG	GAA	GAC	CGG	CTG	743	
		Leu	Trp	Pro	Leu	Phe	His	Tyr	Ile	Gly	Leu	Arg	Gln	Glu	Asp	Arg	Leu		
		200				205				210									
5		GCT	GCC	ACG	CGC	AGC	TTA	CTA	TCC	CAG	TTT	AAC	GCA	TAT	AAA	CGT	GCT	791	
		Ala	Ala	Thr	Arg	Ser	Leu	Leu	Ser	Gln	Phe	Asn	Ala	Tyr	Lys	Arg	Ala		
		215				220				225									
		AAT	CGT	TTG	TTT	GCG	GAG	GCT	GTG	TTC	AAT	TTC	TAC	CAG	GAA	GGG	GAT	839	
		Asn	Arg	Leu	Phe	Ala	Glu	Ala	Val	Phe	Asn	Phe	Tyr	Gln	Glu	Gly	Asp		
10		230				235				240									
		GTG	GTG	TGG	TGC	CAC	GAT	TAC	CAT	CTT	ATG	TTC	CTC	CCC	AGC	TAC	CTC	887	
		Val	Val	Trp	Cys	His	Asp	Tyr	His	Leu	Met	Phe	Leu	Pro	Ser	Tyr	Leu		
		245				250				255									
		AAG	GAG	AAG	GAC	AGC	CAG	ATG	AAA	GTC	GGG	TGG	TTC	CTC	CAC	ACG	CCG	935	
15		Lys	Glu	Lys	Asp	Ser	Gln	Met	Lys	Val	Gly	Trp	Phe	Leu	His	Thr	Pro		
		260				265				270				275					
		TTC	CCC	TCG	TCT	GAG	ATT	TAC	AGA	ACG	CTG	CCG	CTG	CGG	GCC	GAG	CTG	983	
		Phe	Pro	Ser	Ser	Glu	Ile	Tyr	Arg	Thr	Leu	Pro	Leu	Arg	Ala	Glu	Leu		
		280				285				290									
20		CTC	CAA	GGC	GTC	TTA	GCT	GCG	GAT	TTG	GTG	GGG	TTC	CAC	ACA	TAC	GAC	1031	
		Leu	Gln	Gly	Val	Leu	Ala	Ala	Asp	Leu	Val	Gly	Phe	His	Thr	Tyr	Asp		
		295				300				305									
		TAT	GCA	AGG	CAC	TTT	GTT	AGC	GCG	TGC	ACA	CGG	ATA	CTC	GGG	CTG	GAA	1079	
		Tyr	Ala	Arg	His	Phe	Val	Ser	Ala	Cys	Thr	Arg	Ile	Leu	Gly	Leu	Glu		
25		310				315				320									
		GGC	ACT	CCC	GAG	GGT	GTC	GAG	GAT	CAA	GGG	AAG	AAC	ACG	CGA	GTG	GCT	1127	
		Gly	Thr	Pro	Glu	Gly	Val	Glu	Asp	Gln	Gly	Lys	Asn	Thr	Arg	Val	Ala		
		325				330				335									
		GCC	TTC	CCC	GTG	GGG	ATC	GAC	TCG	GAG	CGA	TTT	ATC	GAG	GCC	GTA	GAA	1175	
30		Ala	Phe	Pro	Val	Gly	Ile	Asp	Ser	Glu	Arg	Phe	Ile	Glu	Ala	Val	Glu		
		340				345				350				355					
		ACT	GAT	GCG	GTC	AAG	AAA	CAC	ATG	CAA	GAG	CTG	AGC	CAG	CGT	TTT	GCT	1223	
		Thr	Asp	Ala	Val	Lys	Lys	His	Met	Gln	Glu	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Ala		
		360				365				370									
35		GGT	CGT	AAG	GTT	ATG	TTG	GGG	GTG	GAT	AGG	CTT	GAC	ATG	ATT	AAA	GGA	1271	
		Gly	Arg	Lys	Val	Met	Leu	Gly	Val	Asn	Arg	Leu	Asn	Met	Ile	Lys	Gly		

32

	Thr	Asp	Val	Leu	Glu	Tyr	Gln	Lys	Leu	Thr	Ser	Gln	Val	His	Glu	Ile	
	420						425				430					435	
	GTT	GGT	CGC	ATA	AAT	GGA	CGT	TTC	GGC	TCC	TTG	ACG	GCT	GTT	CCT	ATC	1463
	Val	Gly	Arg	Ile	Asn	Gly	Arg	Phe	Gly	Ser	Leu	Thr	Ala	Val	Pro	Ile	
5					440					445					450		
	CAT	CAC	CTC	GAT	CGC	TCC	ATG	AAA	TTT	CCG	GAG	CTT	TGT	GCC	TTA	TAT	1511
	His	His	Leu	Asp	Arg	Ser	Met	Lys	Phe	Pro	Glu	Leu	Cys	Ala	Leu	Tyr	
					455					460					465		
	GCA	ATC	ACT	GAT	GTC	CTG	CTC	GTG	ACA	TCC	CTG	CGT	GAT	GGC	ATG	AAC	1559
10	Ala	Ile	Thr	Asp	Val	Leu	Leu	Val	Thr	Ser	Leu	Arg	Asp	Gly	Met	Asn	
					470					475					480		
	CTC	GTG	AGC	TAC	GAG	TTC	GTT	GCT	TGC	CAA	AAG	GAT	AAG	AAG	GGC	GCG	1607
	Leu	Val	Ser	Tyr	Glu	Phe	Val	Ala	Cys	Gln	Lys	Asp	Lys	Lys	Gly	Ala	
					485					490					495		
15	CTT	ATT	CTG	AGT	GAG	TTT	GCA	GGC	GCT	GCG	CAG	TCT	CTG	GGT	GCG	GGG	1655
	Leu	Ile	Leu	Ser	Glu	Phe	Ala	Gly	Ala	Ala	Gln	Ser	Leu	Gly	Ala	Gly	
	500				505					510					515		
	TCT	ATC	CTC	ATA	AAT	CCG	TGG	AAT	ATA	ATA	GAG	TCG	TCC	AAC	GCC	ATT	1703
	Ser	Ile	Leu	Ile	Asn	Pro	Trp	Asn	Ile	Ile	Glu	Ser	Ser	Asn	Ala	Ile	
20					520					525					530		
	CGC	CAC	CCT	CTC	AAC	ATG	CCA	GAA	GAA	GAA	CGG	GAA	GAA	CGG	CAT	CGT	1751

33

	GAG	CGC	GTG	GCT	CTT	GAC	GAG	GTA	TTT	GGA	GAG	TTC	GAT	TTG	TGG	CTG	2135
	Glu	Arg	Val	Ala	Leu	Asp	Glu	Val	Phe	Gly	Glu	Phe	Asp	Leu	Trp	Leu	
	660					665				670					675		
	GCG	GCG	GAA	AAC	GGG	ATG	TTT	CTT	CGT	CAT	ACT	CAA	GGG	GAG	TGG	ATG	2183
5	Ala	Ala	Glu	Asn	Gly	Met	Phe	Leu	Arg	His	Thr	Gln	Gly	Glu	Trp	Met	
					680					685					690		
	ACA	ACA	ATG	CCC	GAA	CAT	CTG	AAC	ATG	GAT	TGG	TTG	GAA	AGT	GTA	CAG	2231
	Thr	Thr	Met	Pro	Glu	His	Leu	Asn	Met	Asp	Trp	Leu	Glu	Ser	Val	Gln	
					695					700					705		
10	TTG	GTC	TTT	GAT	TAT	TTT	TGT	GAG	AGG	ACG	CCA	CGC	TCT	TTT	GTC	GAG	2279
	Leu	Val	Phe	Asp	Tyr	Phe	Cys	Glu	Arg	Thr	Pro	Arg	Ser	Phe	Val	Glu	
					710					715					720		
	ACC	CGT	GAG	ACG	TCT	CTG	GTG	TGG	AAC	TAT	AAG	TAT	GCA	GAT	GTT	GAA	2327
	Thr	Arg	Glu	Thr	Ser	Leu	Val	Trp	Asn	Tyr	Lys	Tyr	Ala	Asp	Val	Glu	
15			725					730					735				
	TTC	GGC	AGG	GTG	CAG	GCA	CGT	GAT	ATG	CTA	CAG	CAC	CTG	TGG	ACC	GGG	2375
	Phe	Gly	Arg	Val	Gln	Ala	Arg	Asp	Met	Leu	Gln	His	Leu	Trp	Thr	Gly	
	740					745				750					755		
	CCC	ATA	TCC	AAC	GCT	GCC	GTC	GAC	GTC	GTG	CAA	GGC	GGA	AAG	TCG	GTC	2423
20	Pro	Ile	Ser	Asn	Ala	Ala	Val	Asp	Val	Val	Gln	Gly	Gly	Lys	Ser	Val	
					760					765					770		
	GAG	GTC	CGC	CCC	GTA	GGA	GTC	TCG	AAG	GGG	TCT	GCA	ATT	GAC	CGG	ATT	2471
	Glu	Val	Arg	Pro	Val	Gly	Val	Ser	Lys	Gly	Ser	Ala	Ile	Asp	Arg	Ile	
					775					780					785		
25	CTA	GGC	GAA	ATC	GTG	CAC	AGC	AAA	CAC	ATG	ACG	ATA	CCC	ATC	GAC	TAC	2519
	Leu	Gly	Glu	Ile	Val	His	Ser	Lys	His	Met	Thr	Ile	Pro	Ile	Asp	Tyr	
					790					795					800		
	GTC	CTT	TGC	ATA	GGA	CAC	TTT	TTG	AGC	AAG	GAC	GAG	GAT	ATC	TAC	ACA	2567
	Val	Leu	Cys	Ile	Gly	His	Phe	Leu	Ser	Lys	Asp	Glu	Asp	Ile	Tyr	Thr	
30			805					810					815				
	TTC	TTC	GAA	CCG	GAG	CTG	CCA	CTG	CTG	GAC	AGG	GAC	TCG	TCG	ACG	AGC	2615
	Phe	Phe	Glu	Pro	Glu	Leu	Pro	Leu	Leu	Asp	Arg	Asp	Ser	Ser	Thr	Ser	
	820					825				830					835		
	AAC	GGA	GGG	AAA	CCA	CTG	GGT	GGA	AAG	CTT	CCA	ATA	GAC	CGA	AAG	TCT	2663
35	Asn	Gly	Gly	Lys	Pro	Leu	Gly	Gly	Lys	Leu	Pro	Ile	Asp	Arg	Lys	Ser	
					840					845					850		
	TCA	AAG	AGC	TCC	TCT	CGC	ATG	AAG	CCG	CCA	GTG	TCG	TCA	CCA	AAG	TCA	2711
	Ser	Lys	Ser	Ser	Ser	Arg	Met	Lys	Pro	Pro	Val	Ser	Ser	Pro	Lys	Ser	
					855					860					865		
40	CCC	GGC	CGT	GGA	AGC	GAG	CAG	CAG	CAG	CAA	GCT	GAG	GAG	GCA	AGC	AGA	2759
	Pro	Gly	Arg	Gly	Ser	Glu	Gln	Gln	Gln	Gln	Ala	Glu	Glu	Ala	Ser	Arg	
					870					875					880		
	TGG	GAA	GGA	TCG	TCC	GTG	CTG	GAT	CTC	CAG	GGA	GAG	AAC	TAC	TTC	AGC	2807
	Trp	Glu	Gly	Ser	Ser	Val	Leu	Asp	Leu	Gln	Gly	Glu	Asn	Tyr	Phe	Ser	

34

	885	890	895	
	TGT GCA GTG GGA ACC ATG AAG AGG TCA CTA GCT CGC TAC TGC CTC ACT			2855
	Cys Ala Val Gly Thr Met Lys Arg Ser Leu Ala Arg Tyr Cys Leu Thr			
	900	905	910	915
5	TCT TCA GAG GAG GTG GTG ACA TTC CTG ACC TCG CTC ACA AGC ACA GTG			2903
	Ser Ser Glu Glu Val Val Thr Phe Leu Thr Ser Leu Thr Ser Thr Val			
	920	925	930	
	GCA GCA GCA GCA GGG GCA GGA GCA GGA GCA AGA GCG ACG GGA TCA GGA			2951
	Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Arg Ala Thr Gly Ser Gly			
10	935	940	945	
	GCA GCA GGA GCA GGA GCA GGA GCA GGA GCA GGT GGG GAT CAT GAA GCT			2999
	Ala Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Gly Asp His Glu Ala			
	950	955	960	
	CCA GGA TCA CCA ATC AGG AAA AGC GAT TCG TTC AAG ACG AGC GGG TGG			3047
15	Pro Gly Ser Pro Ile Arg Lys Ser Asp Ser Phe Lys Thr Ser Gly Trp			
	965	970	975	
	CAT AGT CCA ACG CCC CGC TCT CCA AAG CTC GCT CCA GCG GTA CAG TGA			3095
	His Ser Pro Thr Pro Arg Ser Pro Lys Leu Ala Pro Ala Val Gln			
	980	985	990	
20	GATGGAGGGA TGGAAAAAGA CAAGCAAAGC ATCCTTGTC AAGGCACAAG CAAAGCAAGT			3155
	CGCCTTCTGA ATGCAAGCAA AGGCTAAAGC GAGGCCAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA			3215
	AAAAAAAAA			3223

## INFORMACION PARA SEQ ID NO: 2

## I. CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

25 (A) LONGITUD: 994 residuos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

II. TIPO DE MOLECULA: proteína

III. HIPOTETICA: no

IV. ANTI-SENTIDO: no

30 V. TIPO DE FRAGMENTO: proteína completa

## VI. FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Selaginella lepidophylla*

(D) ESTADO DE DESARROLLO: adulto

(F) TIPO DE TEJIDO: micrófilas

35

(C) METODO DE IDENTIFICACION: por similitud con  
secuencias conocidas

(D) OTRA INFORMACION: actividad enzimática bifuncional de  
trehalosa-6-fosfato sintasa y trehalosa-6-fosfato fosfatasa.

```

5 Met Pro Gln Pro Tyr Pro Ser Ser Ser Ser Thr Ser Asn Ala Lys Glu
  1              5              10              15
Ala Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Phe
  20              25              30
Ser Leu Pro Pro Ser Leu Ala Ser Ser Arg Val Glu Arg Leu Val Arg
10              35              40              45
Glu Arg Gln Leu Arg Asn Gln Arg Gln Glu Asp Glu Pro Glu Asp Glu
  50              55              60
Gln Gln Ala Leu Glu Ala Glu Glu Ala Ala Val Ala Ala Thr Glu Val
  65              70              75              80
15 Pro Asp Ala Val Ala Ala Ala Thr Pro Ser Leu Ser Asp Glu Pro Ser
  85              90              95
Lys Ile Ser Ser Gly Arg Gly Gln Arg Leu Leu Val Val Ala Asn Arg
  100             105             110
Leu Pro Leu Ser Ala Thr Arg Lys Gly Glu Thr Glu Trp Asn Leu Glu
20             115             120             125

```

36

305		310		315		320										
Gly	Leu	Glu	Gly	Thr	Pro	Glu	Gly	Val	Glu	Asp	Gln	Gly	Lys	Asn	Thr	
		325				330						335				
	Arg	Val	Ala	Ala	Phe	Pro	Val	Gly	Ile	Asp	Ser	Glu	Arg	Phe	Ile	Glu
5		340				345						350				
	Ala	Val	Glu	Thr	Asp	Ala	Val	Lys	Lys	His	Met	Gln	Glu	Leu	Ser	Gln
		355				360						365				
	Arg	Phe	Ala	Gly	Arg	Lys	Val	Met	Leu	Gly	Val	Asp	Arg	Leu	Asp	Met
		370				375						380				
10	Ile	Lys	Gly	Ile	Pro	Gln	Lys	Leu	Leu	Ala	Phe	Glu	Lys	Phe	Leu	Glu
		385				390						395				400
	Glu	Asn	Ser	Glu	Trp	Arg	Asp	Lys	Val	Val	Leu	Val	Gln	Ile	Ala	Val
				405							410					415
	Pro	Thr	Arg	Thr	Asp	Val	Leu	Glu	Tyr	Gln	Lys	Leu	Thr	Ser	Gln	Val
15		420									425					430
	His	Glu	Ile	Val	Gly	Arg	Ile	Asn	Gly	Arg	Phe	Gly	Ser	Leu	Thr	Ala
		435									440					445
	Val	Pro	Ile	His	His	Leu	Asp	Arg	Ser	Met	Lys	Phe	Pro	Glu	Leu	Cys
		450									455					460
20	Ala	Leu	Tyr	Ala	Ile	Thr	Asp	Val	Leu	Leu	Val	Thr	Ser	Leu	Arg	Asp
	ACE					470					475					480

	660	665	670
	Leu Trp Leu Ala Ala Glu Asn Gly Met Phe Leu Arg His Thr Gln Gly		
	675	680	685
5	Glu Trp Met Thr Thr Met Pro Glu His Leu Asn Met Asp Trp Leu Glu		
	690	695	700
	Ser Val Gln Leu Val Phe Asp Tyr Phe Cys Glu Arg Thr Pro Arg Ser		
	705	710	715 720
	Phe Val Glu Thr Arg Glu Thr Ser Leu Val Trp Asn Tyr Lys Tyr Ala		
10	725	730	735
	Asp Val Glu Phe Gly Arg Val Gln Ala Arg Asp Met Leu Gln His Leu		
	740	745	750
	Trp Thr Gly Pro Ile Ser Asn Ala Ala Val Asp Val Val Gln Gly Gly		
	755	760	765
15	Lys Ser Val Glu Val Arg Pro Val Gly Val Ser Lys Gly Ser Ala Ile		
	770	775	780
	Asp Arg Ile Leu Gly Glu Ile Val His Ser Lys His Met Thr Ile Pro		
	785	790	795 800
	Ile Asp Tyr Val Leu Cys Ile Gly His Phe Leu Ser Lys Asp Glu Asp		
20	805	810	815
	Ile Tyr Thr Phe Phe Glu Pro Glu Leu Pro Leu Leu Asp Arg Asp Ser		
	820	825	830
	Ser Thr Ser Asn Gly Gly Lys Pro Leu Gly Gly Lys Leu Pro Ile Asp		
	835	840	845
25	Arg Lys Ser Ser Lys Ser Ser Ser Arg Met Lys Pro Pro Val Ser Ser		
	850	855	860
	Pro Lys Ser Pro Gly Arg Gly Ser Glu Gln Gln Gln Gln Ala Glu Glu		
	865	870	875 880
	Ala Ser Arg Trp Glu Gly Ser Ser Val Leu Asp Leu Gln Gly Glu Asn		
30	885	890	895
	Tyr Phe Ser Cys Ala Val Gly Thr Met Lys Arg Ser Leu Ala Arg Tyr		
	900	905	910
	Cys Leu Thr Ser Ser Glu Glu Val Val Thr Phe Leu Thr Ser Leu Thr		
	915	920	925
35	Ser Thr Val Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Arg Ala Thr		
	930	935	940

## INFORMACION PARA SEQ ID NO: 3

- I. CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 1910 pares de bases
- 5 (B) TIPO: ácidos nucleicos
- (C) TIPO DE CADENA: doble
- (D) TOPOLOGIA: lineal
- II. TIPO DE MOLECULA: ADNc para ARNm
- III. HIPOTETICA: no
- 10 IV. ANTI-SENTIDO: no
- VI. FUENTE ORIGINAL:
- (A) ORGANISMO: *Selaginella lepidophylla*
- (D) ESTADO DE DESARROLLO: adulto
- (F) TIPO DE TEJIDO: micrófilas
- 15 VII. FUENTE INMEDIATA:
- (A) BIBLIOTECA: ADNc
- (B) CLONA(S): pIBT6
- IX. CARACTERISTICAS:
- (A) NOMBRE: RBS (Sitio de unión del cromosoma)
- 20 (B) LOCALIZACION: de 1 a 110 pares de bases
- IX. CARACTERISTICAS:
- (A) NOMBRE: *sl-tps*
- (B) LOCALIZACION: de 111 a 1910 pares de bases
- (C) METODO DE IDENTIFICACION: por similitud con
- 25 secuencias conocidas
- (D) OTRA INFORMACION: codifica para una trehalosa-6-fosfato sintasa
- AGTGGCGATG GTGGCCATGG TTTGCTGAAT TTGTATTTAG TTAAATTGTT TTTTGCTGCG 60
- GGCGGGTTGT TTTTCTCTT TCTGCTGCGC CGCGTGCGTG TGCAATACCT ATG CCT CAG 119
- 30 Met Pro Gln
- 1
- CCT TAC CCT TCT TCC TCA TCC ACA AGC AAT GCC AAG GAG GCA GGA GGA 167
- Pro Tyr Pro Ser Ser Ser Ser Thr Ser Asn Ala Lys Glu Ala Gly Gly
- 5 10 15
- 35 GGC GCT GCG GCG GCG GGG GGC GGC GGC GGC GGC GCC TTC AGC TTG CCG 215
- Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Phe Ser Leu Pro
- 20 25 30 35
- CCG TCG CTA GCA TCA TCG CGA GTG GAG CGC CTG GTG CGT GAG AGG CAG 263
- Pro Ser Leu Ala Ser Ser Arg Val Glu Arg Leu Val Arg Glu Arg Gln
- 40 45 50



39

	CTG CGG AAT CAA AGG CAG GAG GAT GAA CCT GAG GAT GAG CAG CAG GCG	311
	Leu Arg Asn Gln Arg Gln Glu Asp Glu Pro Glu Asp Glu Gln Gln Ala	
	55 60 65	
	CTG GAG GCG GAG GAA GCG GCG GTG GCG GCT ACC GAG GTG CCC GAT GCC	359
5	Leu Glu Ala Glu Glu Ala Ala Val Ala Ala Thr Glu Val Pro Asp Ala	
	70 75 80	
	GTC GCC GCT GCC ACG CCA TCG CTC TCC GAT GAG CCG TCC AAG ATT TCC	407
	Val Ala Ala Ala Thr Pro Ser Leu Ser Asp Glu Pro Ser Lys Ile Ser	
	85 90 95	
10	AGC GGT CGA GGC CAG CGG TTG CTT GTG GTT GCC AAT CGC CTT CCC TTG	455
	Ser Gly Arg Gly Gln Arg Leu Leu Val Val Ala Asn Arg Leu Pro Leu	
	100 105 110 115	
	TCT GCC ACG AGG AAA GGC GAG ACG GAA TGG AAT TTG GAG ATG AGC GCC	503
	Ser Ala Thr Arg Lys Gly Glu Thr Glu Trp Asn Leu Glu Met Ser Ala	
15	120 125 130	
	GGG GGC CTT GTA AGT GCG CTT TTG GGC GTC AAG CAG TTT GAA GTC ACC	551
	Gly Gly Leu Val Ser Ala Leu Leu Gly Val Lys Gln Phe Glu Val Thr	
	135 140 145	
	TGG ATC GGA TGG CCT GGT GTC TAT GTA CAA GAC GAG AAG GGT GAG AAA	599
20	Trp Ile Gly Trp Pro Gly Val Tyr Val Gln Asp Glu Lys Gly Glu Lys	
	150 155 160	
	TCG CTG CGA GGA GCT CTT GAA GAA AAG GGA TTT GTG CCC GTT CTT CTC	647
	Ser Leu Arg Gly Ala Leu Glu Glu Lys Gly Phe Val Pro Val Leu Leu	
	165 170 175	
25	GAC GAG GCA ACT GTT GAT CAG TAC TAC AAT GGC TAT TGC AAC AAC GTG	695
	Asp Glu Ala Thr Val Asp Gln Tyr Tyr Asn Gly Tyr Cys Asn Asn Val	
	180 185 190 195	
	CTT TGG CCG CTT TTC CAC TAC ATT GGT CTT AGG CAG GAA GAC CGG CTG	743
	Leu Trp Pro Leu Phe His Tyr Ile Gly Leu Arg Gln Glu Asp Arg Leu	
30	200 205 210	
	GCT GCC ACG CGC AGC TTA CTA TCC CAG TTT AAC GCA TAT AAA CGT GCT	791
	Ala Ala Thr Arg Ser Leu Leu Ser Gln Phe Asn Ala Tyr Lys Arg Ala	
	215 220 225	
	AAT CGT TTG TTT GCG GAG GCT GTG TTC AAT TTC TAC CAG GAA GGG GAT	839
35	Asn Arg Leu Phe Ala Glu Ala Val Phe Asn Phe Tyr Gln Glu Gly Asp	
	230 235 240	
	GTG GTG TGG TGC CAC GAT TAC CAT CTT ATG TTC CTC CCC AGC TAC CTC	887
	Val Val Trp Cys His Asp Tyr His Leu Met Phe Leu Pro Ser Tyr Leu	
	245 250 255	
40	AAG GAG AAG GAC AGC CAG ATG AAA GTC GGG TGG TTC CTC CAC ACG CCG	935
	Lys Glu Lys Asp Ser Gln Met Lys Val Gly Trp Phe Leu His Thr Pro	
	260 265 270 275	
	TTC CCC TCG TCT GAG ATT TAC AGA ACG CTG CCG CTG CCG GCC GAG CTG	983
	Phe Pro Ser Ser Glu Ile Tyr Arg Thr Leu Pro Leu Arg Ala Glu Leu	

40)

	280	285	290	
	CTC CAA GGC GTC TTA GCT GCG GAT TTG GTG GGG TTC CAC ACA TAC GAC			1031
	Leu Gln Gly Val Leu Ala Ala Asp Leu Val Gly Phe His Thr Tyr Asp			
	295	300	305	
5	TAT GCA AGG CAC TTT GTT AGC GCG TGC ACA CGG ATA CTC GGG CTG GAA			1079
	Tyr Ala Arg His Phe Val Ser Ala Cys Thr Arg Ile Leu Gly Leu Glu			
	310	315	320	
	GGC ACT CCC GAG GGT GTC GAG GAT CAA GGG AAG AAC ACG CGA GTG GCT			1127
	Gly Thr Pro Glu Gly Val Glu Asp Gln Gly Lys Asn Thr Arg Val Ala			
10	325	330	335	
	GCC TTC CCC GTG GGG ATC GAC TCG GAG CGA TTT ATC GAG GCC GTA GAA			1175
	Ala Phe Pro Val Gly Ile Asp Ser Glu Arg Phe Ile Glu Ala Val Glu			
	340	345	350	355
	ACT GAT GCG GTC AAG AAA CAC ATG CAA GAG CTG AGC CAG CGT TTT GCT			1223
15	Thr Asp Ala Val Lys Lys His Met Gln Glu Leu Ser Gln Arg Phe Ala			
	360	365	370	
	GGT CGT AAG GTT ATG TTG GGG GTG GAT AGG CTT GAC ATG ATT AAA GGA			1271
	Gly Arg Lys Val Met Leu Gly Val Asp Arg Leu Asp Met Ile Lys Gly			
	375	380	385	
20	ATT CCA CAG AAG CTG CTA GCC TTT GAA AAA TTC CTC GAG GAG AAC TCC			1319
	- - - - -			

[illegible]

INFORMACION PARA SEQ ID NO: 4

## I. CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 600 residuos de aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácidos

II. TIPO DE MOLECULA: proteína

III. HIPOTETICA: no

## IV. ANTI-SENTIDO: no

- 25 V. TIPO DE FRAGMENTO: fragmento N-terminal

## VI. FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Selaginella lepidophylla*  
(D) ESTADO DE DESARROLLO: adulto  
(F) TIPO DE TEJIDO: micrófilas

- 30 VII. FUENTE INMEDIATA:

- (A) BIBLIOTECA: ADNC  
(B) CLONA(S): pIBT6

## IX. CHARACTERISTICS:

- 35 (A) NOMBRE: SL-TPS
- (B) LOCALIZACION: de 1 a 600 aminoácidos
- (C) METODO DE IDENTIFICACION: por similitud con  
secuencias conocidas
- (D) OTRA INFORMACION: actividad enzimática de trehalosa-  
6-fosfato sintasa

40 Met Pro Gln Pro Tyr Pro Ser Ser Ser Ser Thr Ser Asn Ala Lys Glu  
1 5 10 15

42

Ala Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Phe  
                     20                    25                    30  
 Ser Leu Pro Pro Ser Leu Ala Ser Ser Arg Val Glu Arg Leu Val Arg  
                     35                    40                    45  
 5 Glu Arg Gln Leu Arg Asn Gln Arg Gln Glu Asp Glu Pro Glu Asp Glu  
                     50                    55                    60  
 Gln Gln Ala Leu Glu Ala Glu Glu Ala Ala Val Ala Ala Thr Glu Val  
                     65                    70                    75                    80  
 Pro Asp Ala Val Ala Ala Ala Thr Pro Ser Leu Ser Asp Glu Pro Ser  
 10                    85                    90                    95  
 Lys Ile Ser Ser Gly Arg Gly Gln Arg Leu Leu Val Val Ala Asn Arg  
                     100                    105                    110  
 Leu Pro Leu Ser Ala Thr Arg Lys Gly Glu Thr Glu Trp Asn Leu Glu  
                     115                    120                    125  
 15 Met Ser Ala Gly Gly Leu Val Ser Ala Leu Leu Gly Val Lys Gln Phe  
                     130                    135                    140  
 Glu Val Thr Trp Ile Gly Trp Pro Gly Val Tyr Val Gln Asp Glu Lys  
                     145                    150                    155                    160  
 Gly Glu Lys Ser Leu Arg Gly Ala Leu Glu Glu Lys Gly Phe Val Pro  
 20                    165                    170                    175  
 Val Leu Leu Asp Glu Ala Thr Val Asp Gln Tyr Tyr Asn Gly Tyr Cys  
                     180                    185                    190  
 Asn Asn Val Leu Trp Pro Leu Phe His Tyr Ile Gly Leu Arg Gln Glu  
                     195                    200                    205  
 25 Asp Arg Leu Ala Ala Thr Arg Ser Leu Leu Ser Gln Phe Asn Ala Tyr  
                     210                    215                    220  
 Lys Arg Ala Asn Arg Leu Phe Ala Glu Ala Val Phe Asn Phe Tyr Gln  
                     225                    230                    235                    240  
 Glu Gly Asp Val Val Trp Cys His Asp Tyr His Leu Met Phe Leu Pro  
 30                    245                    250                    255  
 Ser Tyr Leu Lys Glu Lys Asp Ser Gln Met Lys Val Gly Trp Phe Leu  
                     260                    265                    270  
 His Thr Pro Phe Pro Ser Ser Glu Ile Tyr Arg Thr Leu Pro Leu Arg  
                     275                    280                    285  
 35 Ala Glu Leu Leu Gln Gly Val Leu Ala Ala Asp Leu Val Gly Phe His  
                     290                    300  
 Thr Tyr Asp Tyr Ala Arg His Phe Val Ser Ala Cys Thr Arg Ile Leu  
                     305                    310                    315                    320  
 Gly Leu Glu Gly Thr Pro Glu Gly Val Glu Asp Gln Gly Lys Asn Thr  
 40                    325                    330                    335  
 Arg Val Ala Ala Phe Pro Val Gly Ile Asp Ser Glu Arg Phe Ile Glu  
                     340                    345                    350  
 Ala Val Glu Thr Asp Ala Val Lys Lys His Met Gln Glu Leu Ser Gln  
                     355                    360                    365



## REIVINDICACIONES

1. Un fragmento de ADN aislado y purificado, caracterizado  
5 porque consiste de la secuencia SEQ ID NO:1 o una mutación  
funcionalmente equivalente, que codifica para un polipéptido  
bifuncional con actividad de trehalosa-6-fosfato sintasa y  
trehalosa-6-fosfato fosfatasa.
2. Un fragmento de ADN de conformidad con la cláusula 1,  
10 caracterizado porque se aísla de una planta.
3. Un fragmento de ADN de conformidad con la cláusula 2,  
caracterizado porque la planta de la que se aísla es  
preferentemente la planta de resurrección *Selaginella*  
*lepidophylla*.
- 15 4. Un fragmento de ADN de conformidad con la cláusula 1,  
caracterizado porque codifica para un polipéptido bifuncional  
(SL-TPS/P) con actividad de trehalosa-6-fosfato sintasa y de  
trehalosa-6-fosfato fosfatasa con una secuencia de aminoácidos  
de SEQ ID NO:2 o una mutación funcionalmente equivalente de SEQ  
20 ID NO:2.
5. Un fragmento de ADN aislado y purificado caracterizado porque  
consiste de la secuencia SEQ ID NO:3 o una mutación  
funcionalmente equivalente, que codifica para un polipéptido con  
actividad de trehalosa-6-fosfato sintasa.
- 25 6. Un fragmento de ADN de conformidad con la cláusula 5,  
caracterizado porque se aísla de una planta.
7. Un fragmento de ADN de conformidad con la cláusula 6,  
caracterizado porque la planta de la que se aísla es  
preferentemente la planta de resurrección *Selaginella*  
30 *lepidophylla*.
8. Un fragmento de ADN de conformidad con la cláusula 5,  
caracterizado porque codifica para un polipéptido activo (SL-  
TPS) con actividad de trehalosa-6-fosfato sintasa con una  
secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4 o mutaciones funcionalmente  
35 equivalentes de SEQ ID NO:4.
9. Un gen caracterizado porque comprende en su secuencia el  
fragmento de ADN de la cláusula 4, que codifica para el  
polipéptido SL-TPS/P o una mutación funcionalmente equivalente.

10. Un gen caracterizado porque comprende en su secuencia el fragmento de ADN de la cláusula 8, que codifica para el polipéptido SL-TPS o una mutación funcionalmente equivalente.
11. Un vehículo molecular de expresión caracterizado porque  
5 comprende la secuencia de ADN de la cláusula 1.
12. Un vehículo molecular de expresión caracterizado porque comprende la secuencia de ADN de la cláusula 5.
13. Un huésped modificado genéticamente, caracterizado por contener la secuencia de ADN de la cláusula 1 o una mutación  
10 funcionalmente equivalente.
14. Un huésped modificado genéticamente, caracterizado por contener la secuencia de ADN de la cláusula 5 o una mutación funcionalmente equivalente.
15. Un huésped modificado genéticamente de conformidad con  
15 cualquiera de las cláusulas 13 o 14, caracterizado porque dicho huésped es una planta o una de sus partes, una levadura o una bacteria.
16. Un huésped modificado genéticamente, de conformidad con la cláusula 15, caracterizado por contener altos niveles de  
20 trehalosa.
17. Un huésped modificado genéticamente, de conformidad con la cláusula 15, caracterizado porque es más resistente al frío, calor y estrés hídrico, que el mismo huésped sin modificar.
18. Un huésped modificado genéticamente, de conformidad con la  
25 cláusula 15, caracterizado porque puede producir productos con vida de anaquel incrementada, una vez deshidratados.
19. Un huésped modificado genéticamente, de conformidad con la cláusula 15, caracterizado porque presenta viabilidad incrementada en las células u órganos reproductores.
- 30 20. Un polipéptido SL-TPS/P, caracterizado por presentar una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 o modificaciones funcionalmente equivalentes.
21. Un polipéptido SL-TPS/P de conformidad con la cláusula 20, caracterizado por ser bifuncional presentando tanto actividad de  
35 trehalosa-6-fosfato sintasa como de trehalosa-6-fosfato fosfatasa para la producción de trehalosa.
22. Un polipéptido SL-TPS, caracterizado por presentar una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4 o mutaciones funcionales equivalentes.

23. Un polipéptido SL-TPS de conformidad con la cláusula 22, caracterizado por presentar una actividad de trehalosa-6-fostato sintasa.



1/5

# FIGURA 1

Levadura

TPS 1



56 kD

TPS 2



103 kD

*Selaginella lepidophylla*

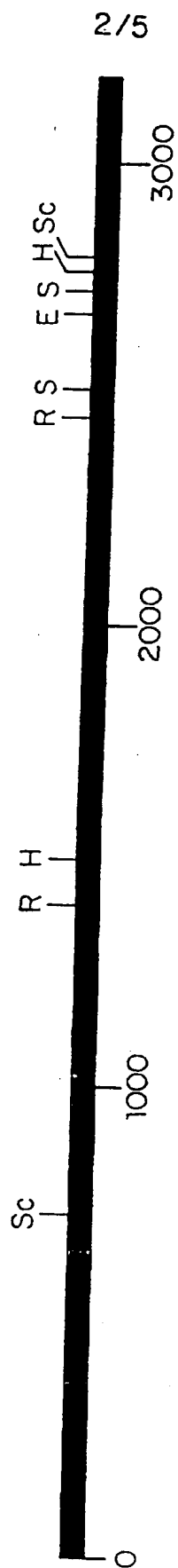
SL-TPS/P



109 kD

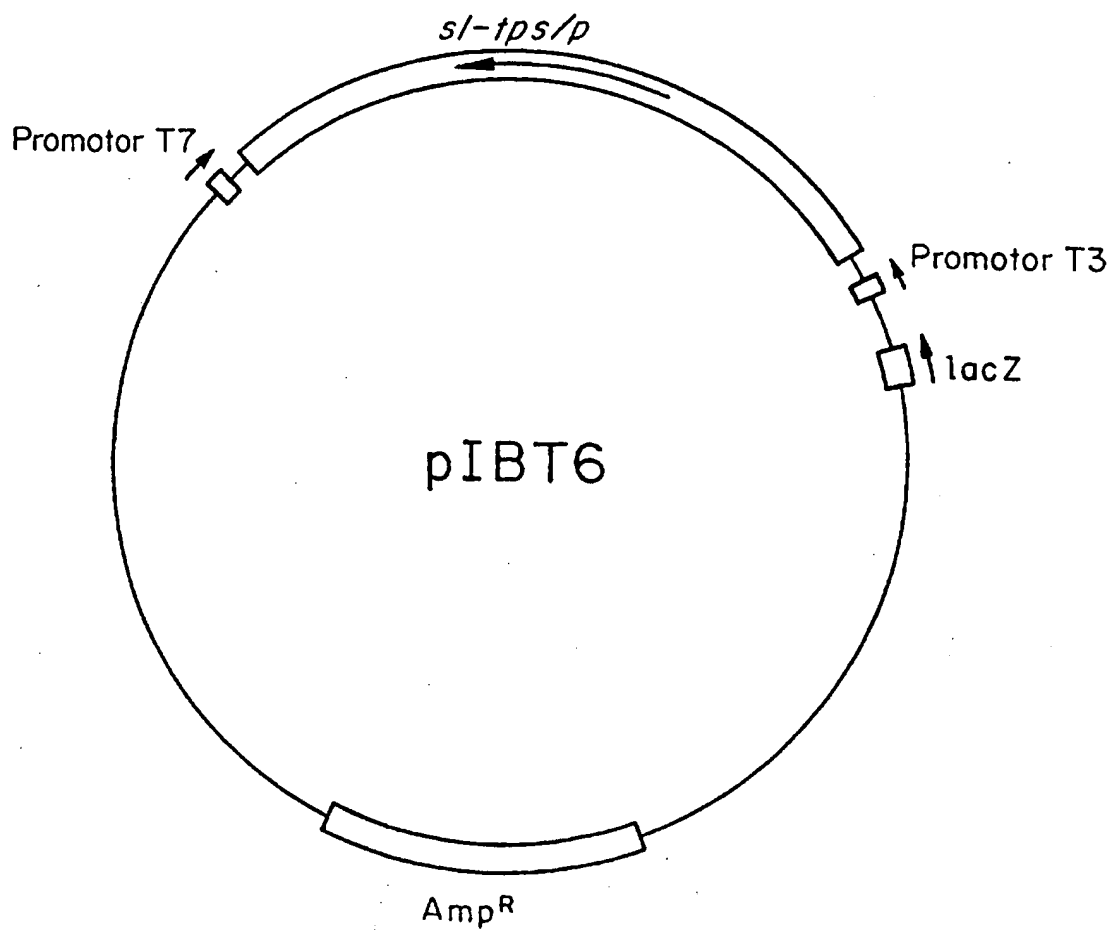
# FIGURA 2

ADNc de *s/-tps/p* (3223 pb)



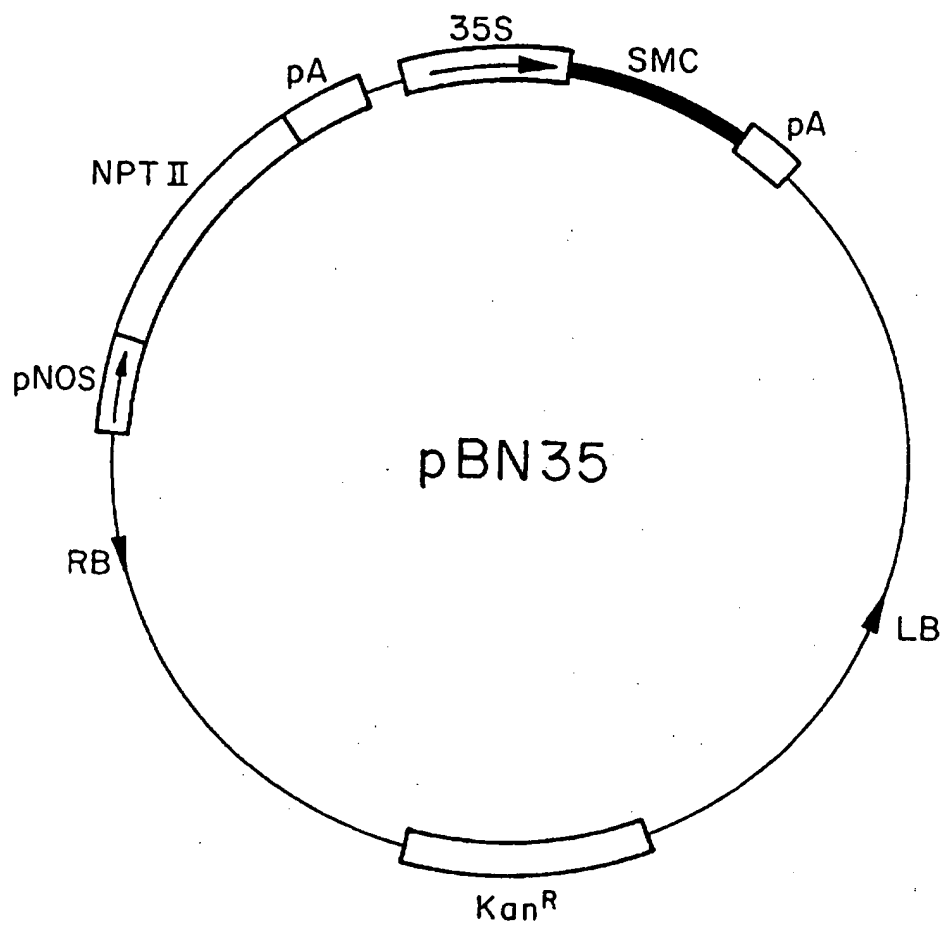
3/5

# FIGURA 3



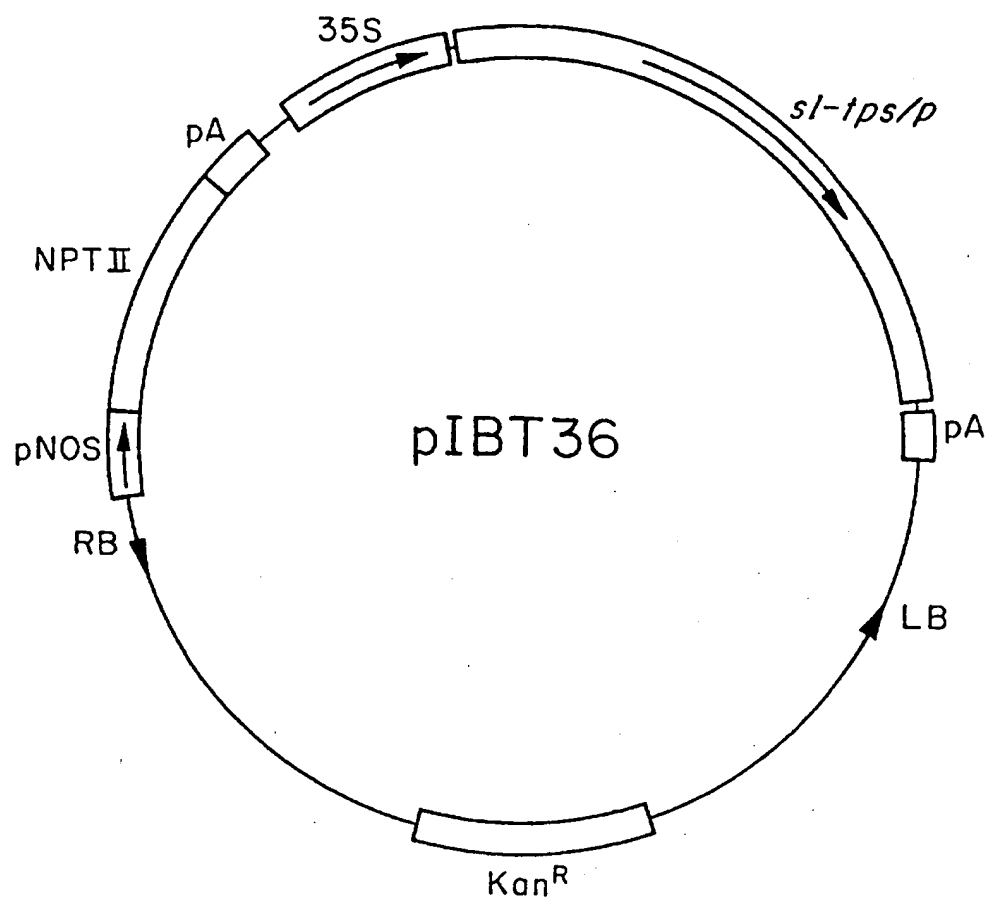
4/5

## FIGURA 4



5/5

# FIGURA 5



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**